

Université de Montréal

**Propriétés biomécaniques *in vitro* des tissus de la sole :
onglon bovin sain vs ulcéré**

par Emma Marchionatti

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option biomédecine

Avril, 2019

© Emma Marchionatti, 2019

Ce mémoire intitulé

Propriétés biomécaniques *in vitro* des tissus de la sole : onglon bovin sain vs ulcéré

Présenté par

Emma Marchionatti

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Monique Doré

Président-rapporteur

Christine Theoret

Directeur de recherche

André Desrochers

Codirecteur

Bertrand Lussier

Membre du jury

Résumé

Les ulcères de sole sont considérés comme l'une des maladies les plus fréquemment associées à la boiterie chez les bovins laitiers, ce qui a une incidence importante sur le bien-être des animaux et la rentabilité des élevages. La mesure dans laquelle les tissus de la sole, sains ou ulcérés, sont capables de maintenir leur structure et leur fonction lorsqu'ils sont soumis à des forces de compression reste inconnue. Par conséquent, les objectifs de la présente étude étaient de documenter les propriétés viscoélastiques des tissus de la sole chez des onglons sains et ulcérés; d'évaluer si l'âge, le poids, le score d'état corporel (SEC) ou les jours en lait (JEL) affectent le comportement mécanique; et de décrire l'histologie des tissus. Des échantillons cylindriques ont été prélevés dans les zones 4 et 6, telles que définies par la carte internationale du pied, sur des onglons bovins latéraux pelviens sains et ulcérés. La biomécanique et la morphologie des tissus ont été évaluées en effectuant des tests de compression et d'histologie avec colorations d'hématoxyline-éosine-phloxine-saffron (HPS), respectivement. Un test t pour comparaisons de deux moyennes a été utilisé pour comparer les zones entre les tissus sains et les tissus ulcérés, tandis qu'un modèle linéaire mixte a été choisi pour évaluer l'association avec les variables indépendantes et un test de Cochran-Mantel-Haenszel pour mesurer l'effet de la zone de l'onglon sur l'histologie. Le SCE avait un effet positif et significatif sur l'épaisseur des tissus mous de la sole et cette dernière était significativement plus élevée en zone 6 qu'en zone 4, mais l'effet était le même pour les onglons sains et ulcérés. Le module fibrillaire (E_f) et la perméabilité (k) des tissus mous étaient statistiquement significativement plus élevés pour les onglons ulcérés que pour les sains, mais seulement en zone 6. Il y avait un effet positif et significatif de l'augmentation du JEL sur E_f . Des scores histologiques égaux ou supérieurs à 3 étaient associés à la présence macroscopique d'ulcération. Une proportion plus élevée de tissu adipeux (30 % et plus) était associée à la zone 6 comparativement à la zone 4, mais aucune différence n'a été observée entre les onglons sains et ulcérés. Les onglons ulcérés présentaient une prévalence plus élevée d'ostéophytes comparés aux sains. Il n'a pas été possible de prouver une association entre le comportement mécanique et les variables indépendantes. De plus, les signes cliniques et histologiques d'ulcération de la sole n'étaient pas associés à une diminution de la force de l'appareil de soutien de la troisième phalange en zone 4 dans cette étude.

Mots-clés : bovin laitier, ulcère de sole, biomécanique, histologie, appareil de support

Abstract

Sole ulcers are reported to be one of the most prevalent diseases associated with lameness in dairy cattle, significantly affecting animal welfare and farm profitability. The degree to which sole tissues, healthy or ulcerated, are able to maintain their structure and function when subjected to compressive forces remains unknown. Therefore, the aims of the present study were to assess sole tissue viscoelasticity in healthy and ulcerated claws; to evaluate whether age, body weight (BW), body condition score (BCS) or days in milk (DIM) affect mechanical behavior; and to describe correlated tissue histology. Cylindrical samples were harvested from zones 4 and 6, as described by the international foot map, from pelvic lateral healthy and ulcerated bovine claws. Tissue biomechanics and morphology were evaluated performing compressive tests and hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HPS) stains, respectively. A *t* test for two means comparisons was used to compare zones' mechanical properties between healthy and ulcerated tissues, while a linear mixed model was chosen to assess association of independent variables and a Cochran-Mantel-Haenszel test to measure the effect of claw zone on histology. BCS had a positive and significant effect on sole soft tissue thickness, which was significantly higher in zone 6 compared to zone 4, but the effect was the same for healthy and ulcerated claws. The fibril modulus (E_f) and permeability (k) of the soft tissue were statistically significantly higher in ulcerated claws compared to healthy claws, but only for zone 6. There was a positive and significant effect of increasing DIM on E_f . Histology scores equal to or greater than 3 were associated with macroscopic presence of ulceration. Higher proportion of adipose tissue (30% and more) was associated with zone 6 compared to zone 4, but no difference was seen between healthy and ulcerated claws. Ulcerated claws had a higher prevalence of osteophytes compared to healthy ones. It was not possible to prove associations of mechanical behavior with independent variables. Moreover, clinical and histological signs of sole ulceration were not associated with decreased strength of the supportive apparatus of the third phalanx in zone 4 in this study.

Keywords : Dairy cattle, lameness, sole ulcer, biomechanics, histology, supportive claw apparatus

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures	9
Liste des abréviations.....	10
Remerciements.....	12
Introduction.....	13
1. Recension littéraire	16
1.1 Anatomie, histologie et fonctions des éléments cutanés de l'onglon	16
1.1.1 Les segments de l'onglon.....	17
1.1.2 Les zones de l'onglon	18
1.1.3 L'appareil de suspension de la troisième phalange.....	19
1.1.4 L'épiderme.....	21
1.1.5 La jonction dermo-épidermique (membrane basale)	25
1.1.6 Le derme ou chorion	26
1.1.7 Le coussinet digital	27
1.2 Propriétés mécaniques de l'onglon	30
1.2.1 Propriétés mécaniques des tissus biologiques.....	30
1.2.2 Viscoélasticité des tissus mous biologiques	31
1.2.3 Propriétés biomécaniques de la corne de l'onglon	35
1.2.4 Propriétés biomécaniques de l'appareil suspenseur.....	41
1.2.5 Analyse par éléments finis	41
1.3 L'ulcère de sole.....	44
1.3.1 Définition	44
1.3.2 Pathogénèse et changements structuraux	44

1.3.3 Signes cliniques et complications	47
1.3.4 Guérison tissulaire de l'ulcère de sole	48
1.3.5 Guérison retardée de l'ulcère de sole.....	51
1.3.6 Gestion clinique de l'ulcère de sole	52
2. Problématique	53
3. Hypothèses et objectifs	54
4. Aspects méthodologiques et résultats préliminaires	55
4.1 Biomécanique	56
4.1.1 Relaxation de contrainte	56
4.1.2 Compression uniaxiale.....	57
4.2 Histologie.....	57
5. Article scientifique.....	60
5.1 Corps.....	60
5.2 Figures.....	76
5.3 Tableaux.....	80
6. Discussion générale	82
Conclusion	86
Bibliographie.....	87

Liste des tableaux

Tableau 1 : Densité et diamètre des tubules de la corne de l'onglon bovin.....	36
Tableau 2 : Module d'élasticité de la corne de l'onglon bovin.....	38
Tableau 3 : Dureté de la corne de l'onglon bovin.....	40

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du doigt bovin.....	16
Figure 2 : Segments de l'onglon bovin.....	17
Figure 3 : Zones de l'onglon bovin.....	18
Figure 4 : Interface dermo-épidermique.....	19
Figure 5 : Distribution des pressions au niveau de la surface solaire du pied bovin.....	21
Figure 6 : Le coussinet digital.....	28
Figure 7 : Échographie des tissus mous de la sole.....	29
Figure 8 : Courbes chargement-temps et déformation-temps pour les matériaux élastiques, viscoélastiques et visqueux.....	31
Figure 9 : Fluage, relaxation de contrainte et hystérèse.....	32
Figure 10 : Compression confinée, compression non confinée et indentation.....	34
Figure 11 : Courbe contrainte-déformation.....	37
Figure 12 : Modèle par éléments finis d'un onglon bovin.....	42
Figure 13 : Pododermatitis circumscripta hemorrhagica.....	44
Figure 14 : Déplacement caudal et concentration des forces compressives en cas de surcroissance de la corne.....	45
Figure 15 : Induction expérimentale d'ulcère de sole.....	45
Figure 16 : Jonction dermo-épidermique (lamelles).....	46
Figure 17 : Zones de prélèvement des échantillons.....	43
Figure 18 : Poinçon artisanal.....	55
Figure 19. Appareillage utilisé pour les tests de relaxation de contrainte en compression pour les tissus mous.	56
Figure 20 : Choix du taux de déformation.....	57

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

APOQ : Association des pareurs d'onglons du Québec

CHDL : Claw horn disruption lesions

DMC : teneur en matière sèche

EGF : Facteur de croissance épidermique

FGF2 : Facteur de croissance des fibroblastes

GM-CSGF : Facteur de croissance de colonie granulocytes-macrophages

IFAP : Protéines associées aux filaments moyens

IGF : Facteur de croissance analogue à l'insuline

IL-1 α : Interleukine-1 alpha

IL-1 β : Interleukine-1 beta

IL-10 : Interleukine-10

JEL : Jours en lait

KGF : Facteur de croissance des kératinocytes

MEC : Matrice extracellulaire

MMPs : Métallo protéinases matricielles

MUFA : Acides gras monoinsaturés

NFACC : National Farm Animal Care Council

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PUFA : Acides gras polyinsaturés

SEC : Score d'état corporel

SFA : Acides gras saturés

TGF- β : Facteur de croissance transformant beta

TIMPs : Inhibiteurs tissulaires de métallo protéinases

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

UTS : résistance ultime à la traction

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

*« If one has curiosity,
then one stands the chance of attaining a high level of scientific inquiry »*

Ada Yonath

Remerciements

À ma directrice, Dre Christine Theoret, pour avoir accepté de me superviser dans ce projet, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et son encouragement continu.

À mon co-directeur, Dr André Desrochers, pour sa grande implication dans le projet, son encadrement et ses conseils.

À Dre Nanny Wenzlow, pour sa participation, sa disponibilité et ses enseignements.

À Dre Isabelle Villemure, pour le partage de ses connaissances et ses remarques toujours pertinentes et attentionnées.

Aux Dr Bertrand Lussier et Dre Monique Doré, pour avoir accepté d'être membre et présidente du jury, pour la relecture attentive et leur contribution.

À tous ceux qui m'ont aidé à compléter les différents aspects de cette étude, Raymond Boulais, Isabelle Nowlan, Jacinthe Cardin, Nancy Veilleux et Guy Beauchamp, aussi bien que le personnel de l'Hôpital des Animaux de la Ferme et de la salle de nécropsie du CDEVQ.

À l'ACVS Foundation, pour avoir financé ce projet.

À ma famille, qui me soutient et m'encourage toujours.

Et enfin, à Dre Caroline Constant, compagne de vie et de travail, pour l'amour, le support, la patience et le partage des connaissances.

Introduction

Le National Farm Animal Care Council du Canada (NFACC) reconnaît la boiterie comme étant indéniablement l'un des problèmes de bien-être les plus importants auxquels l'industrie laitière moderne doit faire face, avec une inquiétude grandissante chez le grand public. Les lésions des onglons sont reconnues, depuis longtemps, comme la principale cause de boiterie chez les bovins laitiers [1]. Les lésions non infectieuses de la boîte cornée de l'onglon, tel que les hémorragies solaires, les ulcères de sole et la maladie de la ligne blanche, ont une incidence et une prévalence élevées dans les élevages de vaches laitières à l'échelle mondiale et affectent de manière significative le bien-être des animaux et la rentabilité des élevages.

L'ulcère de sole chez la vache laitière est reconnue comme la lésion non infectieuse la plus prévalente et coûteuse [1]. L'incidence et la prévalence de cette lésion, en Amérique du Nord, peuvent atteindre des valeurs supérieures à 19% et 32%, respectivement [2, 3]. La prévalence de l'ulcère de sole au Québec a été estimée à 25% selon les données de l'Association des Pareurs d'Onglons du Québec (APOQ) en 2017 [4]. Les lésions des onglons, et notamment les ulcères de sole, entraînent des pertes économiques importantes en termes de baisse de productivité, de coûts de traitement, d'infertilité et de réforme prématurée [5, 6]. Le coût moyen par cas d'ulcère de sole non compliqué a été estimé à 216 US\$ en 2010 [7].

L'ulcère de sole dérive d'une contusion du derme ou chorion solaire et de l'épithélium germinal à l'intérieur de la boîte cornée et d'une subséquente production de corne de mauvaise qualité. Hémorragie et ischémie peuvent survenir au niveau du chorion. En conséquence de la vascularisation dermique altérée, qui est le seul support vasculaire de l'épiderme, et du processus inflammatoire, il y a une perte d'intégrité de la membrane basale ainsi qu'une altération ou une interruption de la prolifération des kératinocytes et de la kératogenèse. Ceci est reconnu comme le premier stade de l'ulcération de la sole, la *pododermatitis circumscripta hemorrhagica*. Cette étape peut évoluer vers une perforation complète de la boîte cornée avec exposition du chorion sous-jacent aux traumatismes supplémentaires et, éventuellement, à une infection (*pododermatitis circumscripta perforata*). Cette deuxième phase de l'ulcération de la

sole peut évoluer vers un troisième stade, lors de l'apparition d'un tissu de granulation exubérant ou d'une infection ascendante (*pododermatitis circumscripta complicata/septica*).

Les ulcères de sole ont été décrits pour la première fois par Rusterholz en 1920 comme une blessure purement mécanique liée à une surcroissance de la corne lorsque les onglons ne sont pas coupés correctement et / ou assez fréquemment [8]. La répartition inégale du poids qui s'ensuit peut créer une concentration des contraintes mécaniques au niveau de la tubérosité du fléchisseur de la troisième phalange et donc une contusion du derme à ce niveau.

La troisième phalange est suspendue à la muraille de l'onglon par des faisceaux des fibres de collagène, dénommé appareil de suspension, et est soutenue par du tissu sous-cutané modifié, le coussinet digital ou appareil de soutien. À partir des années '70 la fourbure sous-clinique a été suggérée comme cause sous-jacente au développement des ulcères de sole [9]. Contrairement à ce qui se passe chez le cheval, la fourbure chez les bovins serait avant tout un processus dégénératif plutôt qu'inflammatoire, car la séparation du chorion laminaire et des lamelles épidermiques n'a jamais été démontrée [10-12]. Les changements hormonaux physiologiques apparaissant lors du vêlage semblent influencer sur l'intégrité de l'appareil suspenseur de la troisième phalange via l'activation des métallo protéinases matricielles (MMPs), entraînant une augmentation de l'élasticité des fibres de collagène et permettant donc à la troisième phalange de descendre à l'intérieur de la boîte cornée [13, 14]. La descente de la troisième phalange serait donc à l'origine de la contusion du chorion solaire.

Le coussinet digital est supposé absorber les impacts et dissiper les forces pendant la marche et le chargement du membre, afin de protéger le chorion et l'épithélium germinale en dessous qui produit la corne [14]. Cette fonction est d'autant plus importante lorsque l'animal est logé en permanence sur des surfaces dures telles que le ciment, où les forces verticales de réaction sont majeures et ne sont pas réparties uniformément. À partir des années 2000, l'appareil de support de la troisième phalange constitué du coussinet digital a été de plus en plus étudié dans la pathogenèse des ulcères de sole [2, 14, 15]. Selon la théorie qui émane de ces études, la perte de gras résultant du bilan énergétique négatif de la période *peri-partum* entraînerait un amincissement de cette structure, provoquant une diminution de sa capacité d'amortissement et une facilité de contusion du chorion accrue. En appui à cette théorie, plusieurs études ont évalué, à l'aide d'échographie, l'épaisseur du coussinet digital et du

chorion (appelés dans leur ensemble tissus mous de la sole) et ont rapporté une association positive avec le score d'état corporel (SEC) et une corrélation avec le développement des lésions de la boîte cornée de l'onglon et, en particulier, de l'ulcère de sole [2, 15-18].

Toutefois, le degré auquel les tissus mous de la sole de l'onglon, sains ou ulcérés, sont capables de maintenir leur structure et leur fonction lorsque soumis aux forces de compression, et le lien entre l'épaisseur des tissus et leurs propriétés mécaniques demeurent inconnus. Une meilleure connaissance des propriétés biomécaniques des tissus qui composent l'onglon devrait permettre de fournir une base pour la compréhension de la pathogénèse et du traitement des lésions, ainsi que pour le développement des stratégies de prévention.

1. Recension littéraire

1.1 Anatomie, histologie et fonctions des éléments cutanés de l'onglon

Le pied bovin consiste en deux doigts (III et IV). Chaque phalange distale et ses structures corrélées (os sésamoïde distal, articulation inter phalangienne distale et bourse naviculaire, attaches des tendons fléchisseur profond et extenseur commun des doigts) sont complètement recouvertes d'une structure cutanée modifiée, l'onglon (Fig.1).

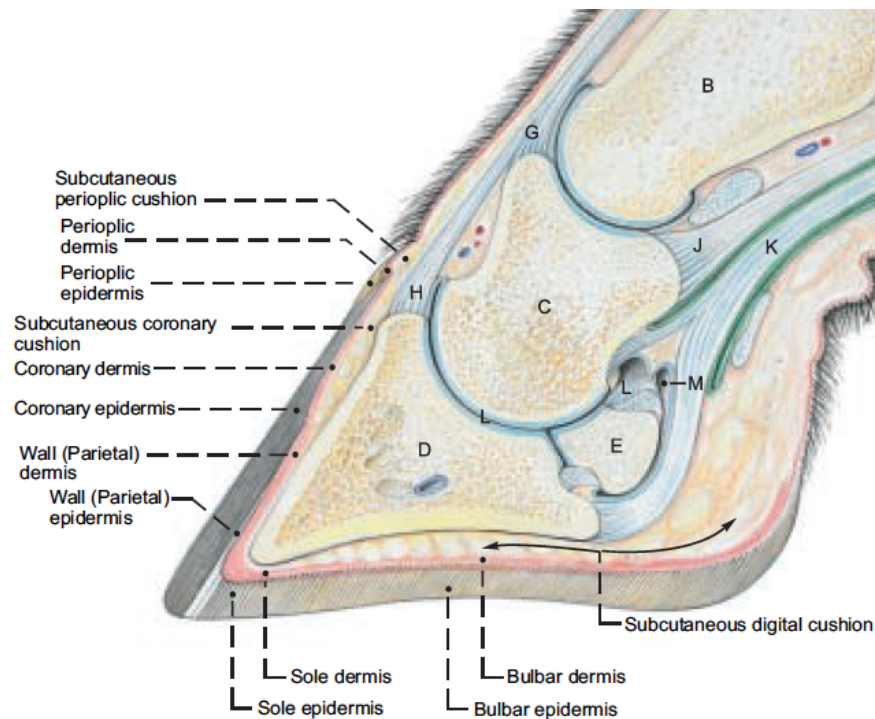


Figure 1 : Anatomie du doigt bovin. Coupe sagittale. B première phalange, C deuxième phalange, D troisième phalange, E os sésamoïde distal, G tendon extenseur latéral du doigts, H tendon extenseur commun du doigts, J tendon fléchisseur superficiel du doigts, K tendon fléchisseur profond du doigts, L articulation inter phalangienne distale, M bourse naviculaire. D'après Budras et al., 2003 [19].

Les onglons médial et latéral sont séparés par l'espace interdigital. L'onglon médial des membres pelviens est plus court et sa surface solaire plus concave comparé à l'onglon latéral. Par conséquent la surface d'appui est plus petite.

Histologiquement l'onglon consiste en 3 couches : l'épiderme, le derme ou chorion et le tissu sous-cutané. Le tissu sous-cutané est absent au niveau de la muraille et de la sole de l'onglon, où il est remplacé par le coussinet digital dans les régions en contact avec le sol et au niveau du périople.

1.1.1 Les segments de l'onglon

L'onglon peut être subdivisé en 6 segments : *périople*, *coronaire*, *muraille*, *sole*, *talon* et segment *interdigital*. Les segments sont facilement identifiables sur préparation par macération en eau chaude après ablation de la boîte cornée (Fig. 2).

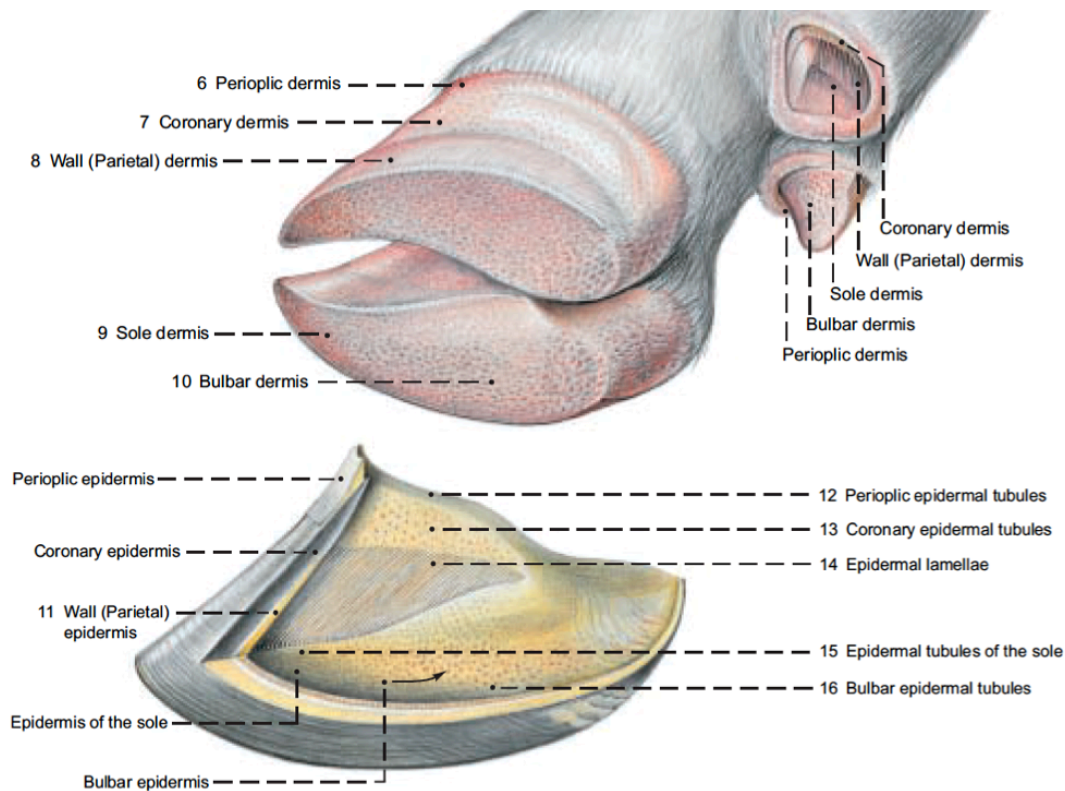


Figure 2 : Segments de l'onglon bovin. Préparation par macération. D'après Budras et al., 2003 [19].

Le *périople* est le premier segment de l'onglon en continuité avec la peau proprement dite. Il est caractérisé par la production d'une corne souple. Distalement au *périople* se retrouvent les segments *coronaire* et de la *muraille*. La corne produite par ces segments forme la muraille de l'onglon, tandis que la corne produite par les segments de la *sole* et du *talon*,

produit la surface solaire de l'onglon. La corne de la muraille et la corne solaire se rejoignent au niveau de la *ligne blanche*. Le bord de la muraille, la ligne blanche, la sole et le talon forment la surface d'appui de l'onglon. Le segment du talon forme la plus grande partie de la surface solaire.

1.1.2 Les zones de l'onglon

Selon la carte internationale du pied, l'onglon bovin est divisé en 12 zones (Fig. 3) [20, 21]. Les zones de 1 à 6 se retrouvent sur la surface solaire, la zone 0 représente la peau interdigitale et la zone 10 l'espace interdigital. Les zones 7 et 8 représentent la partie axiale de la muraille de l'onglon et les zones 11 et 12 la partie abaxiale; la zone 9 indique la peau proximale à la bande coronaire. L'utilisation des zones permet de standardiser l'information dans les dossiers de parage et de boiterie.

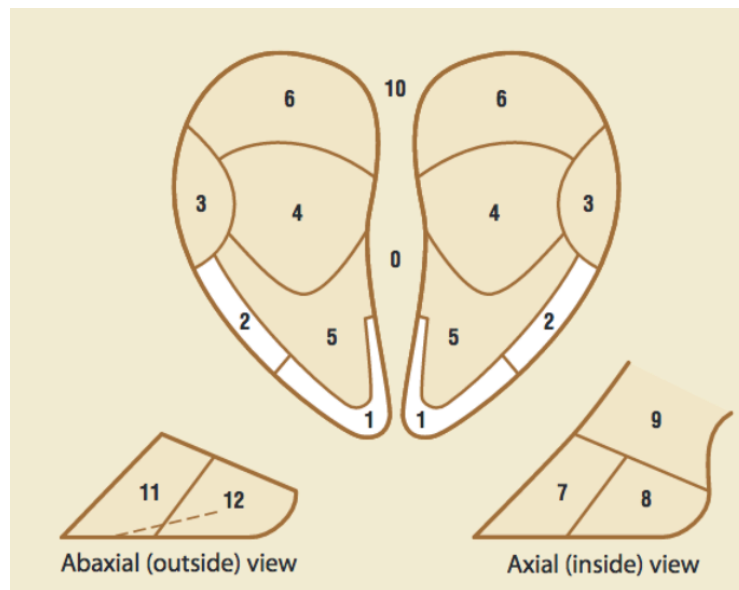


Figure 3 : Zones de l'onglon bovin. D'après ZINPRO® Dairy Claw Lesion Identification Guide.

1.1.3 L'appareil de suspension de la troisième phalange

L'appareil suspenseur de la troisième phalange se compose de tissu conjonctif d'origine dermique et de l'épiderme. Des faisceaux de fibres de collagène, principalement de type VII, ancrés sur la surface de la troisième phalange, courent en direction proximale et dorsale dans les lamelles du derme, pour s'attacher à la membrane basale et au *stratum basale* de l'épiderme de la muraille [22, 23]. Leur angle d'orientation change de proximal à distal et leur épaisseur est accrue au niveau de l'apex de la phalange, ce qu'indique une charge mécanique plus élevée à ce niveau [24]. L'interface entre le derme et l'épiderme au niveau de la muraille est composée de l'inter-digitation des *lamellae* dermiques et épidermiques régulièrement disposées (*lamina sensitiva*) [24] (Fig. 4).

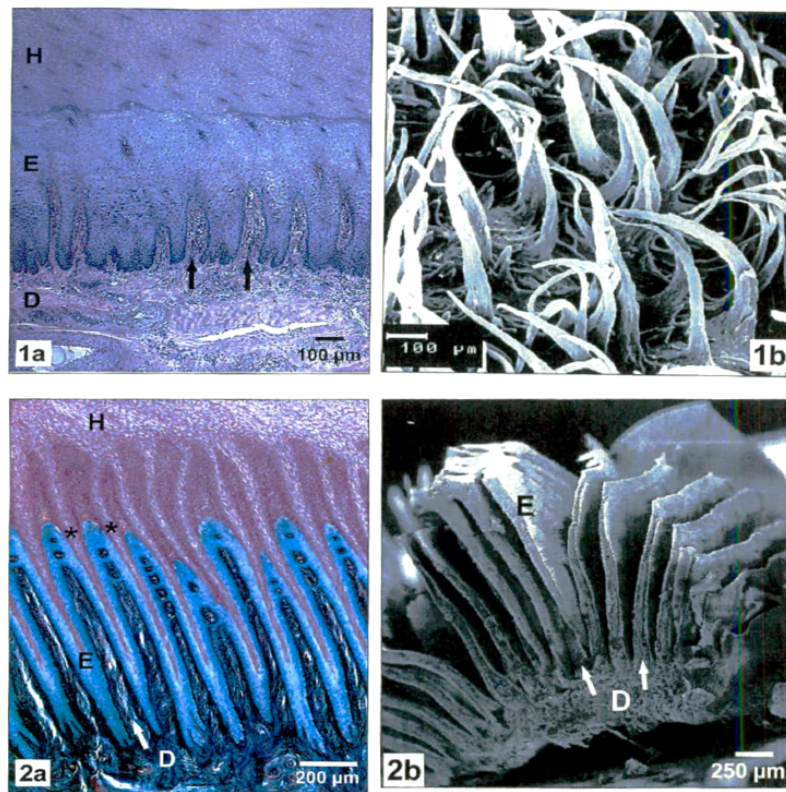


Figure 4 : Interface dermo-épidermique. *Segment du talon (1a-coloration hématoxyline-éosine; 1b-microscopie électronique à balayage) et de la muraille (2a-coloration bleu alcian & PAS; 2b-microscopie électronique à balayage); H corne, E épiderme, D derme. D'après Mülling et al., 2002 [22].*

La pression exercée sur la phalange distale par le poids de l'animal est en partie transformée en forces de tension par l'appareil de suspension. Les forces sont ensuite transférées à travers les couches épidermiques par les desmosomes et les filaments de kératine. Au niveau de la sole les inter-digitations dermo-épidermiques sont disposées irrégulièrement et sont appelées *papillae* (Fig. 4). La partie apicale de chaque papille est orientée vers la pointe de l'onglon et cette orientation détermine la direction des tubules de corne au niveau du *stratum corneum* [22].

La suspension de la troisième phalange dans la boîte cornée chez le bovin se différencie de celle du cheval par la présence de papilles (derme du segment coronaire) au niveau du premier tiers de la muraille et par l'absence des lamelles secondaires au niveau de la *lamina sensitiva* (derme du segment de la muraille). C'est pour cette raison que le bovin ne peut pas mécaniquement supporter un poids aussi important que le cheval sur la muraille de l'onglon. Pour remédier à cette différence anatomique, une partie de forces de pression ne sont pas transformées en tension, mais sont transférées directement sur le coussinet digital, le chorion et la corne de la sole et du talon [24].

Les forces verticales de réaction qui dérivent de l'interaction entre l'onglon et le sol sont distribuées sur la zone de contact de la sole et du talon. Lors du chargement, le talon s'aplatie, les parois de l'onglon se déploient latéralement et les tissus mous absorbent la plus grande part de la pression. Une altération dans la distribution de ces pressions peut causer des dommages aux structures de l'onglon tel que l'épiderme, le chorion ou le coussinet digital.

Van der Tol *et al.* ont démontré que l'onglon latéral du membre pelvien est physiologiquement soumis à une plus grande pression comparé à l'onglon médial, et que la pression maximale est exercée principalement au niveau de la sole (Fig. 5) [25]. Lors de la marche, l'onglon latéral contacte le sol avant l'onglon médial, et le talon se trouve à être la région de contact initial [26]; la charge est ensuite transférée en avant vers la pointe de l'onglon. Pendant le contact initial avec une surface dure, l'onglon latéral absorbe l'ensemble de l'impact qui est ensuite redistribué aux deux onglons [26]. Toutefois une surcharge initiale de l'onglon latéral peut entraîner une contusion du coussinet digital et du chorion au niveau de la tubérosité du fléchisseur de la phalange distale. La contusion des tissus mous peut entraîner à son tour des troubles vasculaires.

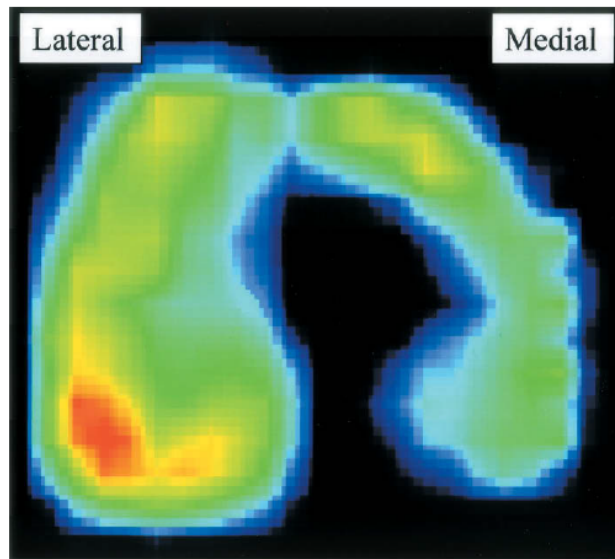


Figure 5 : Distribution des pressions au niveau de la surface solaire du pied bovin. *Membre pelvien gauche*. Code des couleurs : bleu 1-5 N/cm^2 , azur 15-30 N/cm^2 , vert 30-45 N/cm^2 , jaune 45-60 N/cm^2 , rouge 60-75 N/cm^2 . D'après Van der Tol et al., 2002 [25].

1.1.4 L'épiderme

L'épiderme de l'onglon est composé de cellules épidermiques, les kératinocytes, vivant au niveau des strates *basale*, *spinosum* et *granulosum*, et d'une couche épaisse de cellules mortes kératinisées et cornifiées au niveau du *stratum corneum*. Les *stratum basale* et *spinosum* sont aussi appelés dans leur ensemble *stratum germinativum* ou couche germinale. Les cellules épidermiques du *stratum basale* sont constamment en contact avec la membrane basale [27].

Les connections intercellulaires entre les kératinocytes sont formées par les desmosomes et le ciment intercellulaire. Chaque cellule épidermique contient des plaques denses aux électrons connectés par des filaments de kératine qui forment le cytosquelette. Celui-ci est à son tour connecté aux desmosomes. Des glycoprotéines desmosomales spécifiques établissent les adhésions intercellulaires [27].

Les cellules du *stratum basale* génèrent la progéniture qui migre progressivement aux couches supra basales. L'activité mitogène dans les strates suivantes devient progressivement moins importante, jusqu'à ce que les cellules abandonnent de façon permanente leur cycle de

vie et se différencient en cellules hautement kératinisées et cornifiées au niveau du *stratum corneum*.

1.1.4.1 Stratum basale

Le *stratum basale* consiste en une seule couche de cellules cylindriques liées à la membrane basale par des hemidesmosomes [27]. L'aspect basal des kératinocytes, lorsqu'examiné avec la microscopie électronique à balayage, montre des micro-plis qui s'étendent dans le derme en augmentant la superficie de contact dermo-épidermique [22].

Les kératinocytes du *stratum basale* sont en multiplication active et remplacent progressivement les cellules cornifiées qui exfolient. Malgré que les kératinocytes soient séparés des fibroblastes dermiques par la membrane basale, l'homéostasie entre leur multiplication et différenciation est maintenue grâce aux interactions entre ces deux types de cellules, aussi connu sous le vocable de *cross-talk* [28]. Une étude *in vitro* a démontré que les unités formant des colonies de kératinocytes se développent uniquement en présence de fibroblastes dermiques [28]. Le fibroblaste sert de source de facteurs de croissance et d'autres cytokines qui orchestrent la croissance et le développement des kératinocytes. Les cytokines interleukine-1 alpha (IL-1 α) et interleukine-1 beta (IL-1 β) contrôlent l'expression du facteur de croissance de kératinocytes (KGF) et du facteur de stimulation de colonie de granulocytes-macrophages (GM-CSF) pendant l'homéostasie épidermique normale [28, 29]. Le KGF et le GM-CSF sont d'origine dermique et ils régulent la prolifération et la différenciation des kératinocytes du *stratum basale*. Les kératinocytes produisent les interleukines IL-1 α et IL-1 β en réponse à la stimulation du KGF et du GM-CSF, et ces interleukines stimulent à leur tour l'expression du KGF et du GM-CSF au niveau des fibroblastes dermiques [29]. En cas d'ulcère de sole il y a une augmentation importante dans le taux de IL-1 β et du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), et une augmentation minime dans le taux de IL-1 α , une augmentation dans l'expression des récepteurs du KGF mais une diminution de l'expression du KGF, ainsi qu'une augmentation de l'interleukine-10 (IL-10), puissante cytokine anti-inflammatoire [29].

1.1.4.2 Stratum spinosum

Le *stratum spinosum* consiste en plusieurs couches de cellules irrégulières. Comparativement à la peau, on retrouve jusqu'à 120 couches de kératinocytes au niveau du *stratum spinosum* de l'onglon [30]. Les filaments de kératine qui forment le cytosquelette du *stratum spinosum* sont plus importants dans cette couche comparativement au *stratum basale*. Cette différence fournit une plus grande résistance mécanique à la cellule tout en préservant sa flexibilité [27].

Pendant le processus de synthèse de kératine, les cellules se réorientent perpendiculairement au *stratum basale* et deviennent élargies, aplaties et polygonales au fur et à mesure qu'elles progressent vers le *stratum corneum* [30].

1.1.4.3 Stratum granulosum

Le *stratum granulosum*, qui forme la troisième couche, n'existe que dans les régions où une corne souple est produite (*périople* et *segment interdigitale*). Il est formé de 3 à 5 couches de cellules aplaties disposées parallèlement à la membrane basale [27].

1.1.4.4 Stratum corneum

Le *stratum corneum* est constitué d'une grande densité de cellules complètement kératinisées et cornifiées. Les processus de kératinisation et de cornification sont induits par de multiples changements cellulaires. Ceux-ci mènent graduellement à la mort cellulaire en rendant les cellules incapables de se diviser. Les cellules du *stratum corneum* sont déplacées graduellement vers la surface par la migration des cellules des couches plus profondes [27].

1.1.4.5 La production de la corne

La production de la corne de l'onglon commence au niveau du *stratum basale* et se termine avec la mort des kératinocytes à la fin de leur cycle de vie au niveau du *stratum corneum*. Le processus de différenciation cellulaire des kératinocytes est nommé *kératinisation*. La kératinisation des cellules épidermiques implique la production continue de protéines de kératine qui remplacent progressivement le contenu cellulaire. La production de kératine commence dans les cellules basales et augmente dans les strates supra basales.

Deux différents groupes de kératine existent : les filaments de kératine et les protéines associées aux filaments moyens (IFAP). Les filaments de kératine forment une matrice stable et régulière et sont alignés parallèlement au long axe de la cellule, liés entre eux par les IFAP. La kératinisation progressive de la cellule lui procure rigidité et donc résistance mécanique [30]. Une altération dans la synthèse de la kératine est associée à des altérations dans la topologie des kératinocytes. Celles-ci contribuent à la détérioration de la corne et à la perte de force de sa structure, par exemple en cas d'ulcère de sole [31].

Chaque cellule est fermement liée aux cellules voisines à travers les desmosomes et la substance intercellulaire de cimentation. Cette dernière est produite par les kératinocytes du *stratum spinosum* et consiste en glycoprotéines, phospholipides et céramides. Ses principales fonctions sont de créer une adhésion entre les kératinocytes, de fournir la stabilité mécanique à la corne (glycoprotéines) et de conférer des propriétés imperméables afin de prévenir la déshydratation ou la surhydratation cellulaire [30].

Les différentes régions de l'onglon (muraille, sole, talon) sont caractérisées par des patrons variables de kératine ainsi qu'une composition distincte de la substance intercellulaire de cimentation. Cela explique la variabilité des caractéristiques mécaniques de la corne aux différentes régions.

1.1.4.6 L'architecture de la corne

L'épiderme forme de la corne tubulaire dans les régions où les papilles dermiques sont présentes, alors que des lamelles de corne sont produites dans la région laminaire de la muraille où il y a présence de lamelles dermiques. La corne tubulaire consiste en de tubules construits autour des papilles dermiques, connectés par la corne intertubulaire. Chaque tubule consiste en une couche corticale externe qui origine de l'épiderme autour de la papille dermique, et d'une couche médullaire interne qui origine de l'épiderme à l'apex de la papille dermique.

1.1.4.7 Fonction et qualité de la corne

Les principales fonctions de la corne de l'onglon sont de protéger les tissus des facteurs mécaniques, chimiques et biologiques environnementaux et de transférer les forces entre le squelette et le sol. Une corne de qualité est importante pour assurer ces fonctions.

Les propriétés mécaniques de la corne de l'onglon, telles que sa dureté et son élasticité, sont déterminées par sa structure histologique et son architecture. La qualité de la kératinisation dépend d'un approvisionnement adéquat en nutriments et en oxygène par le chorion. Le diamètre et la densité des tubules, ainsi que le ratio entre cellules corticales et médullaires et la relation entre corne tubulaire et intertubulaire, déterminent la qualité de la corne même [30].

1.1.5 La jonction dermo-épidermique (membrane basale)

La membrane basale, fréquemment appelée jonction dermo-épidermique, est composée de trois couches [27]. La première, la *lamina densa*, forme une ligne médiane dense aux électrons lorsqu'elle est observée à la microscopie électronique. À l'extérieur de celle-ci se trouve la *lamina rara* qui forme une base pour les cellules mitotiques de la partie vivante de l'épiderme. Ces deux couches sont dérivées des cellules épidermiques. La couche intérieure de la membrane basale est la *lamina fibroreticularis* qui consiste en un ancrage de fibres de collagène qui relie la membrane basale au réseau de fibres de collagène dans le derme. Cette couche, produite par des fibroblastes dermiques, est la partie de la membrane basale la plus sensible à la dégradation par les MMPs. Les structures ciblées par les MMPs activées sont les fibres de collagène d'ancrage composées de collagène de type VII et les laminines dont la *lamina rara* et la *lamina densa* sont aussi riches. Les MMPs jouent un rôle important dans le renouvellement normal du tissu conjonctif, mais une augmentation de la forme active des MMPs est aussi rencontrée lors des ulcères de sole [32].

La jonction dermo-épidermique est une structure d'importance cruciale pour l'intégrité et la fonctionnalité de l'onglon. Elle permet la connexion de l'épiderme au chorion sous-jacent et module l'approvisionnement des cellules en oxygène et nutriments provenant des vaisseaux sanguins dermiques.

La membrane basale est particulièrement importante pour la régulation de la prolifération et la différenciation des kératinocytes. La cascade qui résulte en ces processus est activée par des stimuli mécaniques et biochimiques, tels que les facteurs de croissance et les cytokines. Différents facteurs de croissance, par exemple le facteur de croissance épidermique (EGF), migrent à travers la membrane basale et se lient aux récepteurs spécifiques dans le *stratum basale* et *spinosum* [27, 33]. L'inhibition de l'EGF, puissant mitogène, peut déterminer l'inhibition de la synthèse de la kératine [33]. Le contrôle hormonal joue lui aussi un rôle sur la production de kératine. La synthèse de protéines dans les couches épidermiques suprabasales est stimulée en présence d'insuline, tandis qu'elle peut être inhibée en présence de prolactine, à cause de son effet d'inhibition de l'EGF, ou en présence de cortisol [33].

Pour ce qui est des facteurs mécaniques, la pression exercée sur la sole de l'onglon est transférée à travers l'épiderme au *stratum basale* et stimule la prolifération cellulaire, ce qui accélère la production de corne. Au niveau de la muraille, le stimulus mécanique menant à l'augmentation de la prolifération cellulaire résultant en la production de corne est créé par les forces de tension.

Une perte d'intégrité de la membrane basale est déterminante dans l'altération du processus de kératinisation. Cette perte d'intégrité peut être le résultat d'une protéolyse extracellulaire causée par une augmentation de l'expression des MMPs, en particulier la MMP2 et la MMP9 [32].

1.1.6 Le derme ou chorion

Le derme, ou chorion, se trouve sous la membrane basale. Il est principalement composé d'un dense tissu conjonctif riche en fibroblastes et fibres de collagène contenus dans une matrice extracellulaire. Le derme est divisé en deux régions qui diffèrent selon la composition et l'organisation de la matrice extracellulaire. Le *derme papillaire* se retrouve adjacent à l'épiderme et il forme des papilles dermiques entre les crêtes épidermiques ; au niveau du segment de la muraille il forme des lamelles. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche riche en fibres de collagène de type I et III et en fibres élastiques perpendiculaires à l'épiderme. Le plexus vasculaire (*rete subpapillare*) démarque la limite entre derme papillaire et *derme réticulaire*. Ce dernier est un tissu conjonctif plus dense composé de faisceaux de

grosses fibres de collagène, principalement de type I, et de fibres élastiques. Un plexus vasculaire profond (*rete cutaneum*) marque la limite du derme réticulaire.

La fonction principale des fibroblastes est de synthétiser les composants de la matrice extracellulaire y compris collagène, élastine et fibrilline, et de la matrice extrafibrillaire y compris glycosaminoglycanes, protéoglycanes et fibronectine, des facteurs de croissance et des enzymes dont des MMPs et les inhibiteurs tissulaires de métallo protéinases (TIMPs). Les fibroblastes interagissent avec les kératinocytes et produisent du collagène de type IV, composant majeur de la *lamina densa*, et de type VII, composant principal des fibres d'ancrage [23].

Le derme est richement vascularisé et innervé. En revanche, l'épiderme est un tissu avasculaire. Les kératinocytes dépendent donc du chorion pour s'alimenter en nutriments et en oxygène. Le chorion forme de longues *lamellae* et *papillae* qui se prolongent dans l'épiderme (*lamina sensitiva*). Celles-ci permettent de diminuer la distance entre les cellules épidermiques et les vaisseaux dermiques et donc de faciliter la diffusion de nutriments et d'oxygène. La dépendance de l'épiderme pour la diffusion de nutriments et d'oxygène rend ce dernier très sensible aux altérations de la microcirculation dermique. Conséquemment, une grande majorité des lésions de la boîte cornée de l'onglon résultent d'un trauma au chorion et à sa vascularisation.

1.1.7 Le coussinet digital

Le coussinet digital est composé macroscopiquement de trois coussinets cylindriques (axial, moyen et abaxial) qui sont disposés parallèlement au tendon fléchisseur profond des doigts dans la partie proximale du talon. Chacun est constitué de tissu conjonctif lâche et tissu adipeux, entourés par du tissu conjonctif riche en fibres de collagène. Le coussinet moyen se dirige en direction apicale sous la tubérosité du fléchisseur de la troisième phalange. Les coussinets axial et abaxial se dirigent vers la pointe de la troisième phalange en se déployant et se rejoignant avec de multiples digitations (Fig. 6) [14, 34].

Histologiquement un réseau de tissu conjonctif dense, entre le derme réticulaire et le périoste de la troisième phalange, sépare les coussinets en plusieurs compartiments [34]. Sa structure est semblable à celle du coussinet plantaire chez l'homme où un arrangement

réticulaire des fibres de collagène et d'élastine forment des compartiments contenant du tissu adipeux [35]. Le coussinet absorbe les chocs et protège contre la concentration de stress local [34, 36].

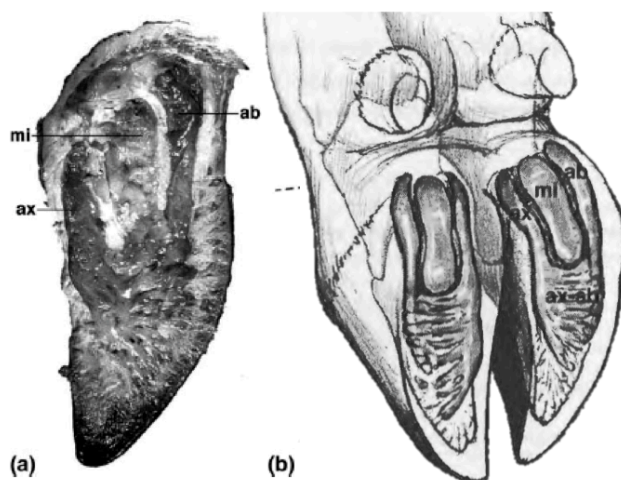


Figure 6 : Le coussinet digital. (a) Chorion et coussinets digitaux axial, moyen et abaxial en coupe transverse le long de la surface de la troisième phalange; (b) schéma des coussinets et leur disposition anatomique; ax axial, mi moyen, ab abaxial. D'après Råber et al., 2004 [34].

La concentration en lipides des coussinets est généralement plus élevée chez les vaches adultes que chez les taures. Cette caractéristique semble être associée à une meilleure absorption des chocs [37]. Contrairement aux autres tissus adipeux tel que le gras périrénal et le gras sous-cutané, la teneur totale en lipides des coussinets est inférieure et le pourcentage des acides gras mono insaturés (MUFA) plus élevée. De plus la proportion de MUFA, en particulier C18:1, est supérieure et celle des acides gras saturés (SFA) inférieure chez les vaches adultes relativement aux taures [37]. Les MUFAs sont responsables d'un gras plus tendre. D'une manière similaire, le coussinet plantaire humain contient une concentration de SFA inférieure et de MUFA supérieure comparativement au gras sous-cutané abdominal [38]. Il est postulé qu'une disproportion dans le ratio SFA:acide gras polyinsaturé (PUFA) peut altérer la viscosité du gras intracellulaire et donc affecter les propriétés biomécaniques du tissu graisseux. Cependant aucune différence n'a pas été mise en évidence entre coussinet plantaire humain normal et atrophie [38].

Au niveau des zones avec un faible contenu en lipides, la proportion d'acide arachidonique (AA), un PUFA, est plus grande, mais sa concentration est moins élevée chez les vaches adultes. Råber et *al.* ont émis l'hypothèse que la baisse dans la concentration de AA serait due à une augmentation dans la production des prostaglandines, dont le AA est précurseur, en raison d'une inflammation chronique induite par une surcharge de l'onglon [37].

L'épaisseur du coussinet digital est considérée comme un facteur important pour sa fonction d'amortissement et de protection du chorion [34, 37] et a été démontrée être un facteur modérément héritable et fortement corrélé aux CHDL [39]. L'évaluation échographique de l'épaisseur des tissus mous de la sole (coussinet digital et chorion) (Fig. 7) a permis de mettre en évidence une association positive entre l'épaisseur et le score d'état corporel de l'animal (SEC) et une association linéaire négative entre l'épaisseur et la moyenne de gris de l'image échographique [15]. Ce dernier pourrait indiquer une altération de la composition du coussinet en parallèle à un changement de l'épaisseur. Une interprétation possible pour expliquer l'association temporelle entre diminution du SEC et de l'épaisseur du coussinet digital, est la mobilisation du gras du coussinet pendant une période de bilan énergétique négatif tel qu'en début de lactation [15, 17]. Toutefois, aucune étude ne fournit des informations sur le métabolisme des lipides dans le coussinet digital bovin.

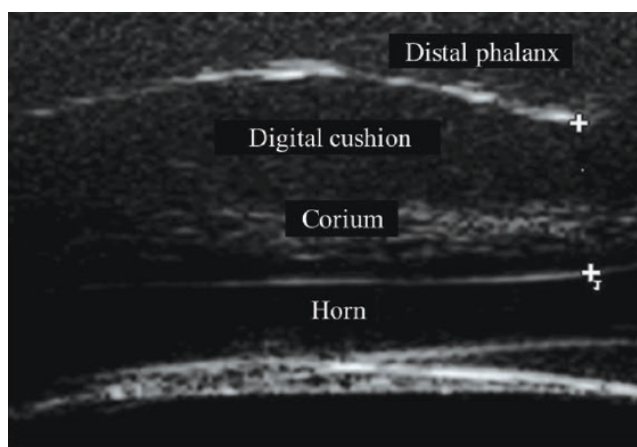


Figure 7 : Échographie des tissus mous de la sole. Sonde linéaire de 5cm, fréquence 7.5 MHz, B-mode. D'après Newsome et al., 2017 [17].

1.2 Propriétés mécaniques de l'onglon

1.2.1 Propriétés mécaniques des tissus biologiques

Un des objectifs des études biomécaniques est d'établir les propriétés mécaniques des tissus biologiques ainsi que de développer des modèles mathématiques pour aider à décrire et caractériser ultérieurement leur comportement lors de différentes conditions de charge. Le comportement mécanique des tissus est caractérisé par ses propriétés mécaniques intrinsèques, qui permettent de décrire la réponse de ces tissus sous des conditions de charge. Les études biomécaniques utilisent couramment des méthodes et des principes d'ingénierie, mais il est important de souligner que les tissus biologiques ont des caractéristiques différentes des matériaux d'ingénierie. Par exemple, les tissus biologiques peuvent s'adapter aux différentes conditions d'expérimentation en altérant leurs propriétés mécaniques (auto-adaptation) et leurs propriétés mécaniques ont tendance à changer avec l'âge. De plus, la plupart des tissus biologiques sont composés de différents matériaux avec des propriétés spécifiques, ce qui signifie que les propriétés mécaniques peuvent varier d'un point à l'autre à l'intérieur du tissu et que la réponse peut varier selon la direction d'application des forces. Les propriétés mécaniques rapportées pour les tissus biologiques sont donc des approximations seulement et les modèles mathématiques utilisés pour décrire le comportement du tissu sont généralement limités à la description de la réponse sous conditions de charge spécifiques.

Mécaniquement, tous les tissus sont des matériaux composites. Parmi les composants des tissus biologiques, les propriétés mécaniques des fibres de collagène et d'élastine sont le déterminant majeur du comportement global du matériau. Le collagène est une protéine hélicoïdale fibrillaire organisée en fibres. Chaque fibrille peut mécaniquement être considérée comme un ressort entouré d'une substance fondamentale riche en eau. Les fibres de collagène ont donc deux phases, solide-liquide, conférant un comportement viscoélastique avec une relativement haute résistance à la traction et une faible résistance à la compression. L'élastine est une protéine avec un comportement élastique caractérisé par une haute extensibilité, qui est aussi réversible.

1.2.2 Viscoélasticité des tissus mous biologiques

Les propriétés mécaniques intrinsèques des tissus mous biologiques sont généralement déterminées à l'aide de tests mécaniques expérimentaux (en compression) suivis par l'application d'un modèle mathématique aux courbes expérimentales.

Les tissus mous biologiques présentent un comportement viscoélastique, ce qui signifie que, sous charge mécanique, ils se comportent comme une combinaison d'un matériau élastique et d'un matériau visqueux [40, 41]. Un matériau élastique se déforme instantanément lorsque soumis à une charge et reprend sa forme d'origine quand la force est retirée (comportement temps-indépendant) (Fig. 8b). Un matériau visqueux se déforme graduellement et ne retrouve plus sa forme originale après retrait de la charge (comportement temps-dépendant) (Fig. 8d). Les tissus viscoélastiques subissent une déformation instantanée élastique, qui est suivie par une déformation visqueuse dépendant du temps jusqu'à l'équilibre (Fig. 8c).

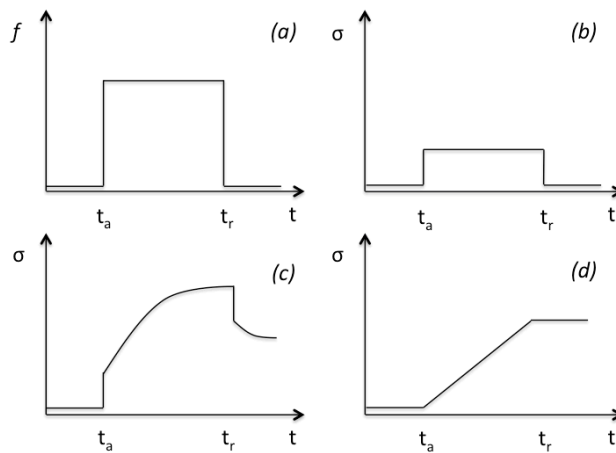


Figure 8 : Courbes chargement-temps et déformation-temps pour les matériaux élastiques, viscoélastiques et visqueux. (a) courbe chargement (f) versus temps, où le chargement est appliqué instantanément à t_a et relâché à t_r ; (b, c, d) réponse déformation (σ) versus temps pour le cycle chargement-temps (a) pour un matériau purement élastique (b), viscoélastique (c) et visqueux (d). D'après Callister 2007 [41].

Un tissu viscoélastique possède des caractéristiques de relaxation de contrainte, fluage, sensibilité au taux de déformation et hystérèse [40]. La relaxation de contrainte se produit quand un tissu est chargé à un taux de déformation ($\dot{\sigma}$) constant; la contrainte (ϵ) développée

dans le tissu diminue graduellement dans le temps (t) (Fig. 9c et 9d). La relaxation de contrainte est sensible au taux de déformation : plus grand le taux de chargement, plus la contrainte maximale est grande et, conséquemment, plus la magnitude de la relaxation de contrainte est grande. De plus, la réponse ne dépend pas seulement du taux de déformation mais aussi de la vitesse à laquelle la déformation est appliquée. Contrairement à la relaxation de contrainte, le fluage survient lorsqu'une force (f) constante est appliquée; le déplacement (d) augmentera dans le temps (Fig. 9a et 9b). Les courbes de chargement et déchargement (obtenues sur une courbe force-déformation) des matériaux viscoélastiques ne suivent pas le même patron. La différence de l'aire sous la courbe entre les courbes de chargement et déchargement est appelée zone d'hystérèse et représente l'énergie perdue par le tissu, normalement sous forme de chaleur (Fig. 9e).

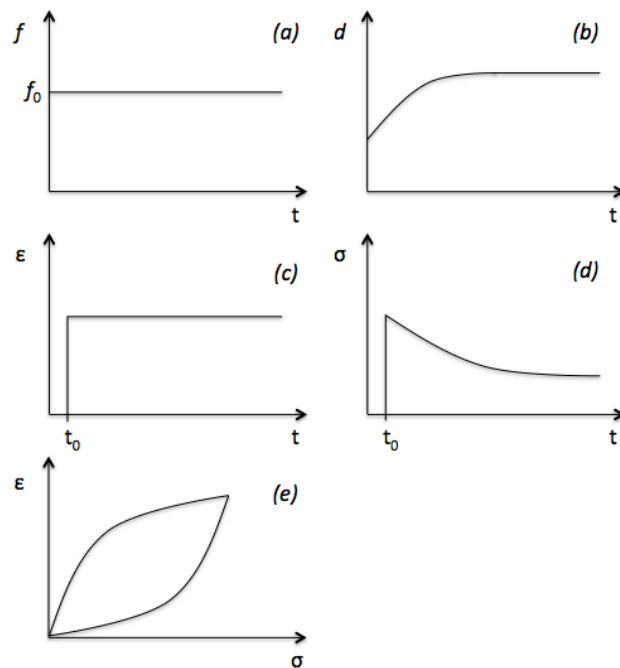


Figure 9 : Fluage, relaxation de contrainte et hystérèse. *Schéma démontrant le fluage (a, b), la relaxation de contrainte (c, d) et l'hystérèse (e).*

1.2.2.1 Viscoélasticité de la peau

La peau est un tissu biologique qui montre un comportement viscoélastique dépendant de l'historique du chargement et qui réagit en conséquence. Le derme et l'épiderme sont constitués d'une matrice extracellulaire poreuse contenant du liquide, ainsi que des fibres de

collagène, des protéoglycanes et des fibres d'élastine qui lui confèrent extensibilité et élasticité, d'où le comportement viscoélastique. Le derme est caractérisé principalement par l'élasticité car riche en collagène et fibres d'élastine, tandis que l'épithélium germinale est défini par des éléments visqueux. Peu d'information existe sur les propriétés mécaniques du gras sous-cutané.

Le coussinet plantaire humain est un gras sous-cutané modifié. Il est composé d'un réseau de fibres de collagène et d'élastine qui crée des compartiments qui entourent le tissu adipeux [35]. Cette structure en compartiments permet de résister aux charges compressives. Il montre un comportement viscoélastique dû à ses composantes visqueuses (adipocytes) et élastique (collagène). Les rôles du coussinet plantaire chez l'homme sont d'absorber les chocs (élasticité) et de prévenir les collisions entre le calcaneum et le sol. Une surcharge et une concentration des contraintes de façon répétitive peuvent déchirer le réseau de fibres de collagène et réduire l'intégrité des compartiments graisseux, altérant le comportement mécanique du tissu. Les propriétés biomécaniques du coussinet plantaire ont été étudiées en cas d'épaisseur altérée, du syndrome de la douleur en talon et d'ulcères diabétiques. Il a été démontré que le coussinet plantaire humain devient plus rigide avec l'âge, et que sa propriété d'absorption des chocs diminue [42]. De plus, l'épaisseur a été rapportée être un facteur déterminant les contraintes mesurées dans les tissus et l'atrophie du coussinet plantaire est une entité clinique souvent associée aux maladies du collagène, tel que l'arthrite rhumatoïde [42]. L'atrophie du coussinet plantaire n'est pas décrite seulement chez les patients affectés par le syndrome de la douleur en talon, mais elle est aussi connue dans le vieillissement, et chez les patients obèses ou souffrant de maladies chroniques.

Chez le bovin, à date, seulement le comportement mécanique de la corne (*stratum corneum* de l'épiderme) et de l'appareil suspenseur ont été étudiés.

1.2.2.2 Test expérimentaux en compression

Un test en compression prévoit l'application d'une force axiale comprimant l'échantillon. Pour les tissus mous biologiques, trois types de test peuvent être utilisés : la compression confinée, la compression non confinée et l'indentation. En compression confinée l'échantillon de tissu est placé dans une chambre de confinement et comprimé avec un filtre

poreux permettent l'exsudation de fluide interstitiel axialement (Fig. 10a). Le test de compression non confinée permet une déformation latérale et l'exsudation de fluide interstitiel en direction latérale car il n'utilise pas une chambre de confinement (Fig. 10b). La compression est appliquée localement dans le cas d'un test d'indentation (Fig. 10c). Bien que le test d'indentation soit le seul test dont l'utilisation n'est pas limitée au laboratoire et qui peut être réalisé aussi *in vivo*, il est difficile de standardiser les propriétés mécaniques car elles dépendent de l'indenteur et de l'échantillon.

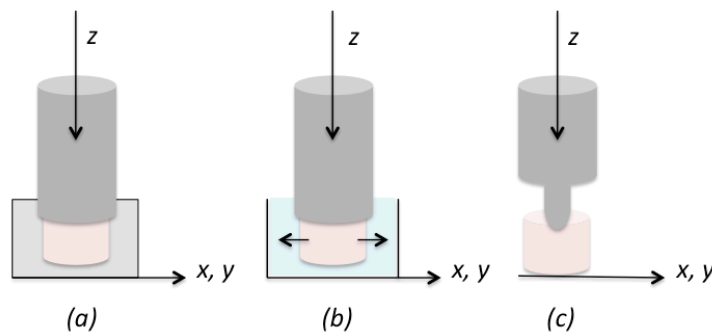


Figure 10 : Compression confinée, compression non confinée et indentation. *Schéma démontrant la compression confinée (a), la compression non confinée (b) et l'indentation (c).*

Les tests en compression sont réalisés sous forme de deux techniques, le fluage et la relaxation de contrainte. Un test de fluage prévoit l'application d'une contrainte constante au tissu et la mesure de sa déformation en fonction du temps. Le test de relaxation de contrainte prévoit qu'un tissu soit soumis à un taux de déformation contrôlé, suivi par une déformation constante. La contrainte requise pour supporter cette déformation est alors mesurée en fonction du temps; elle diminue en raison d'un réarrangement moléculaire. Pendant ces tests, l'échantillon de tissu est généralement immergé dans une solution saline.

1.2.2.3 Modèles pour décrire le comportement mécanique

La peau présente une relation contrainte-déformation non-linéaire et relaxe sous contrainte constante. La description du comportement mécanique de la peau exige donc un modèle anisotrope, non-linéaire, viscoélastique. Les modèles disponibles décrivent le comportement mécanique du derme et le tissu sous-cutané n'est normalement pas incorporé

dans un modèle pour la peau. Un modèle visco-hyperélastique a été développé pour prédire le comportement mécanique du coussinet plantaire humain [36, 43].

D'autres modèles ont été développés pour d'autres tissus biologiques tels que les tissus cartilagineux. Le modèle renforcé de fibrilles considère que la rigidité totale du tissu est due à une combinaison de la rigidité de la matrice et de la rigidité en tension des fibrilles de collagène, et suppose que le collagène est en grande partie responsable de la viscoélasticité de la phase solide [44]. Le modèle non-linéaire poroélastique renforcé de fibrilles permet d'évaluer le comportement non-linéaire en compression non confinée [45]. La matrice isotrope est décrite par le module élastique (E_m), le coefficient de Poisson (ν_m) et la perméabilité (k); le réseau des fibrilles est décrit par le module d'élasticité de chaque fibrille (E_f).

1.2.3 Propriétés biomécaniques de la corne de l'onglon

La corne de l'onglon est un matériau biologique composite qui doit résister à des charges élevées sans subir une déformation excessive ni un échec catastrophique; par conséquent, les principales propriétés mécaniques d'intérêt sont la dureté, la ténacité, la résistance et la viscoélasticité.

Les propriétés mécaniques de la corne de l'onglon sont déterminées, au niveau structural, par les dimensions et la distribution des tubules et, au niveau cellulaire, par les kératinocytes. La qualité de la corne dépend de l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules épidermiques productrices de kératine, cellules qui sont très sensibles aux perturbations de la circulation sanguine du chorion [22]. De plus, les propriétés mécaniques des matériaux kératinisés sont influencées par leur degré d'hydratation [46, 47].

La kératine est un matériau composite constitué de microfibrilles intégrées dans une matrice amorphe non fibreuse, formée de protéines globulaires. La matrice lie les fibres et leur transmet des contraintes, ce qui aide à résister aux forces de compression. Les microfibrilles sont constituées de faisceaux de protofibrilles formés par une hélice- α d'acides aminés. Les cellules kératinisées sont organisées en structures tubulaires ou en matériau inter tubulaire, formant ainsi un composite macroscopique. La corne de la muraille de l'onglon possède un grand nombre de tubules aplatis dans la zone externe et un plus petit nombre de tubules ovales

dans la zone interne. Au niveau de la corne bulbaire et solaire on retrouve quelques grands tubules à l'intérieur de l'abondante substance inter tubulaire (Tab. 1) [48].

Localisation	Nombre des tubules, mm ⁻²	Diamètre des tubules, µm	
		Minimum	Maximum
Muraille dorsale–zone externe	64.49 ± 14.41	12.17 ± 2.85	38.80 ± 7.98
Muraille dorsale–zone interne	57.10 ± 10.92	26.22 ± 16.41	55.16 ± 20.38
Muraille abaxiale–zone externe	62.28 ± 23.27	12.61 ± 3.00	45.09 ± 15.28
Muraille abaxiale–zone interne	50.89 ± 21.28	23.20 ± 7.98	48.05 ± 17.05
Sole (bulbe)	8.22 ± 4.09	39.21 ± 21.50	74.31 ± 27.17

Tableau 1 : Densité et diamètre des tubules de la corne de l'onglon bovin. *Valeurs moyennes ± déviation standard. D'après Franck et al., 2006 [48].*

Les propriétés mécaniques de la corne de l'onglon investiguées à ce jour sont le module d'élasticité, la limite d'élasticité, le coefficient de Poisson, la dureté, la résistance à la perforation et la ténacité.

La corne de l'onglon est un matériel viscoélastique [48] dont les propriétés sont influencées par les caractéristiques environnementales telles que la température et l'humidité. Le module de Young ou d'élasticité (E) est un paramètre approprié pour définir les caractéristiques biomécaniques d'un biomatériau tel que la corne de l'onglon [48, 49]. Il représente la résistance à la déformation de la corne et il est calculé à l'intérieur d'une plage de déformation non-destructive. Le module d'élasticité est le rapport entre la contrainte (σ) et la déformation (ϵ) le long du plan de déformation :

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

où E est le module de Young (MPa), σ la contrainte (MPa) et ϵ la déformation de l'échantillon divisée par son aire d'origine (%). Contrairement à l'élasticité, la rigidité de la corne est une mesure de la capacité de l'onglon de résister à une déformation lors du contact avec le sol. Graphiquement le module d'élasticité est représenté par la pente de la courbe contrainte-

déformation dans sa partie linéaire (Fig. 11). Les valeurs du module d'élasticité rapportées pour la corne sont résumées dans le Tableau 2. Il a été montré qu'à la fois l'humidité et la fourbure chronique entraînent une réduction marquée du module d'élasticité, qui se traduit par une résistance réduite au trauma et à l'usure [46, 50]. En outre, le module d'élasticité varie selon la zone de l'onglon [51].

Sur la courbe contrainte-déformation, le point où la contrainte commence à varier de façon non-linéaire avec la déformation représente la limite d'élasticité ou Yield point (Fig. 11). Au delà de ce point le tissu n'est plus capable de soutenir une charge supplémentaire en raison d'un changement dans ses propriétés (déformation plastique). La limite d'élasticité représente le point où les myofibrilles de kératine perdent leur disposition en hélice alpha [52]. La limite d'élasticité rapportée pour la corne de la muraille testée en flexion en trois points et pour la corne à la jonction sole-bulbe testée en compression à une vitesse de 1mm/min est de 14.3 ± 3.3 MPa (muraille dorsale), 10.7 ± 4.5 MPa (muraille abaxiale) et 56 ± 12 MPa respectivement [48].

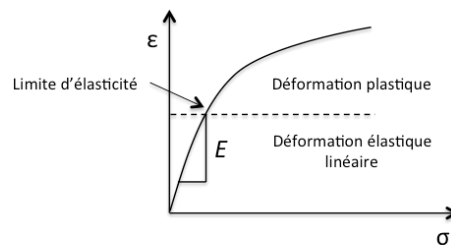


Figure 11 : Courbe contrainte-déformation. ϵ contrainte, σ déformation, E module d'élasticité.

Le coefficient de Poisson (ν) représente le rapport entre la déformation transverse (contraction) et la déformation longitudinale (élongation) dans la direction de la force de traction. La valeur du coefficient de Poisson rapportée pour la corne de la muraille testée en traction est 0.38 ± 0.02 [48].

	Localisation	Protocole expérimental	Module d'élasticité (E) (MPa)
Hinterhofer et al., 2005 [49]	Muraille dorsale		688.6 ± 480.5
	Muraille abaxiale	Tension, 1mm/min	363.9 ± 287.2
	Muraille axiale		440.5 ± 239.5
	Sole		159.2 ± 137.2
Franck et al., 2006 [48]	Muraille dorsale	Flexion en trois points, 1mm/min	382 ± 98
	Muraille abaxiale		261 ± 109
	Muraille dorsale	Flexion en trois points, 15mm/min	417 ± 108
	Muraille abaxiale		291 ± 105
	Sole (bulbe)	Compression, 1mm/min	13.6 ± 1.68
Hinterhofer et al., 2007 [50]	Muraille dorsale		520.9 ± 336.5 (CL)
	Muraille abaxiale		243.8 ± 153.8 (CL)
	Muraille axiale	Tension, 1mm/min	339.9 ± 352.9 (CL)
	Sole		97.8 ± 123.6 (CL)
Apprich et al., 2008 [53]	Muraille dorsale		398 ± 250 (FC)
			263 ± 185 (CC)
	Muraille abaxiale		161 ± 60 (FC)
			165 ± 133 (CC)
	Muraille axiale	Tension, 1mm/min	291 ± 181 (FC)
			225 ± 165 (CC)
Winkler 2005 [51]	Sole (zone 4)		102.4
	Ligne blanche (zone 2)	Tension, 1mm/min	87.9

Tableau 2 : Module d'élasticité de la corne de l'onglon. *FC onglon plat, CC onglon en tirebouchon, CL fourbure chronique.*

L'humidité affecte significativement la dureté de la corne [47]. La dureté d'un matériau définit la résistance à une déformation plastique localisée (indentation). La résistance d'une surface à la déformation plastique est évaluée par l'analyse de l'impression d'un pénétrateur défini. Les méthodes communément utilisées pour l'évaluation de la dureté des matériaux non métalliques sont la méthode d'indentation à la bille et le duromètre Shore D. Les deux, lorsqu'utilisés pour évaluer la dureté de la corne de l'onglon, montrent des résultats comparables [54]. La méthode d'indentation à la bille utilise une sphère métallique qui est pressée dans un échantillon à une pression définie et la profondeur de l'empreinte est ensuite mesurée. Le duromètre Shore D utilise une pyramide de diamant, qui est pressée dans le matériau à l'étude; plus le matériau est dur, plus le degré de pénétration est petit.

La résistance de la corne à l'usure et aux facteurs environnementaux dépend de la dureté de la corne même. La corne de l'onglon bovin absorbe l'eau rapidement et sa dureté diminue proportionnellement. Toutefois la corne de l'onglon ne possède pas la même dureté dans toutes les zones de l'onglon, avec la muraille étant la zone la plus dure et la jonction sole talon la plus souple [47]. Cette différence est due au nombre de tubules par unité de surface, au rapport entre couche corticale et couche médullaire des tubules, et à la quantité de corne inter tubulaire. Borderas *et al.* ont montré que les animaux ayant des onglons plus souples ont tendance à avoir des lésions de la boîte cornée plus sévères, bien que les altérations de la dureté de la corne ne mènent pas forcément à l'apparition d'un plus grand nombre de lésions d'onglon [47]. De plus, la dureté de la corne de la sole est significativement inférieure à celle de la corne de la muraille et peut indiquer une prédisposition de la corne solaire aux blessures compressives. Les valeurs de dureté rapportées pour la corne sont résumées dans le Tableau 3.

	Localisation	Protocole expérimental	Dureté
Borderas et al., 2004 [47]	Muraille dorsale et abaxiale	Shore D	77.9 ± 3.5 HU
	Sole	Shore D	45.9 ± 14.2 HU
Hinterhofer et al., 2005 [54]	Muraille dorsale	Dureté de pénétration à la bille	20.1 ± 5.1 N/mm ²
		Shore D	62.9 ± 3.7 HU
	Muraille abaxiale	Dureté de pénétration à la bille	15.8 ± 5.1 N/mm ²
		Shore D	58.4 ± 4.2 HU
	Sole	Dureté de pénétration à la bille	8.9 ± 3.1 N/mm ²
		Shore D	44.5 ± 7.9 HU

Tableau 3 : Dureté de la corne de l'onglon. *HU* : unités de dureté.

Une corne de mauvaise qualité (perte de résistance structurelle) peut fournir moins de protection aux structures sous-jacentes et augmenter le risque de pénétration d'un corps étranger. La résistance à la perforation dénote la capacité relative d'un matériau à inhiber l'intrusion d'un corps étranger (aiguille). Winkler & Margerison ont développé la méthode de la résistance à la perforation pour la corne de l'onglon. La résistance à la perforation a été montrée comme étant corrélée aux altérations vasculaires du chorion, avec une diminution associée à une augmentation des hémorragies et du score des lésions [46].

La ténacité d'un matériau est sa capacité à résister à la propagation d'une fissure ou la quantité d'énergie qu'un matériau peut absorber avant de se briser. Clark & Petrie ont évalué la ténacité de la corne provenant d'onglons bovins sains et onglons avec fissures verticales. Cependant, puisque aucune différence n'a été mise en évidence entre les deux groupes étudiés, il a été conclu que la formation de fissures verticales ne dépend pas directement des propriétés biomécaniques de la corne [55].

1.2.4 Propriétés biomécaniques de l'appareil suspenseur

Les composantes du chorion, collagène, élastine et protéoglycanes, déterminent ses propriétés mécaniques. Le collagène, composante majeure, est responsable de la résistance ultime à la traction (UTS) et de la réponse élevée à la déformation. L'élastine et les protéoglycanes ont un effet significatif particulièrement à des faibles degrés de déformation; cela affecte la capacité de rebondissement après application de contraintes ou déformations. Le stress mécanique stimule la production de fibres élastiques [56] et un stress accru subi par l'onglon pourrait donc augmenter la production des fibres élastiques [57].

La jonction dermo-épidermique et le chorion ont été testés en traction jusqu'à rupture, à une vitesse quasi-statique de 25-30 mm/min jusqu'à 120 mm/min [11, 13, 58]. Ces tests ont montré que la muraille abaxiale est le segment capable de supporter les plus grandes contraintes comparé à la muraille dorsale et axiale. Suite aux essais de traction la plupart des échantillons déchiraient au niveau de la jonction dermo-épidermique et du *stratum réticulaire* du chorion, rarement au niveau des lamelles épidermiques ou à la jonction entre chorion et os de la troisième phalange [11, 58]. Une diminution du module d'élasticité (rigidité) et de la limite d'élasticité de l'appareil suspenseur de la troisième phalange, de même qu'une augmentation du déplacement (laxité), ont été observés chez les animaux en période peri-partum (-2 à +12 semaines peri-partum) lorsque comparé aux animaux du même âge mais non gestants [13]. De plus, ces altérations sont accentuées quand les animaux sont logés en stabulation libre avec logettes comparé à ceux logés sur litière profonde de paille [57]. Fait intéressant, malgré la présence de signes histologiques de fourbure dans un modèle de fourbure aigue par surcharge en oligofructose, il n'y avait aucun effet au niveau de la rigidité [11].

1.2.5 Analyse par éléments finis

L'analyse par éléments finis est une technique largement utilisée en ingénierie qui permet d'analyser les contraintes et les déformations d'un matériau particulier en une géométrie définie. La forme du modèle, l'orientation (isotropie/anisotropie), le module d'élasticité et le coefficient de Poisson du matériau sont les quatre paramètres nécessaires pour la solution d'un modèle d'éléments finis. La forme ou géométrie du modèle est idéalisée en

unités géométriques plus petites, les éléments finis, permettant à l'ordinateur de simplifier les formes complexes, tel que l'onglon bovin, en une forme géométrique définie et calculable. Les propriétés matérielles appropriées sont attribuées à chaque élément et l'ordinateur peut ensuite calculer déformation et contrainte dans des conditions de charge données. L'analyse par éléments finis calcule approximativement le comportement contrainte-déformation réel du modèle.

Hinterhofer *et al.* ont conçu un modèle précis et détaillé d'un onglon bovin à géométrie réelle (Fig. 12) [59]. Ce modèle ne représente que la boîte cornée d'un onglon individuel et ne tient pas compte de l'appareil suspenseur et celui de support de la troisième phalange, ni de l'interaction entre les deux onglons. L'ajout des structures internes à la boîte cornée (troisième phalange, chorion, coussinet digital, ligaments et tendons) pourrait donc améliorer le modèle. Le même groupe de chercheurs a aussi conçu un modèle du pied bovin incluant os (phalanges et os sésamoïdiens), moelle osseuse, tissus mous (tendons fléchisseurs et peau) et boîte cornée, dans l'objectif de mieux comprendre la fonction biomécanique des deux doigts [60].

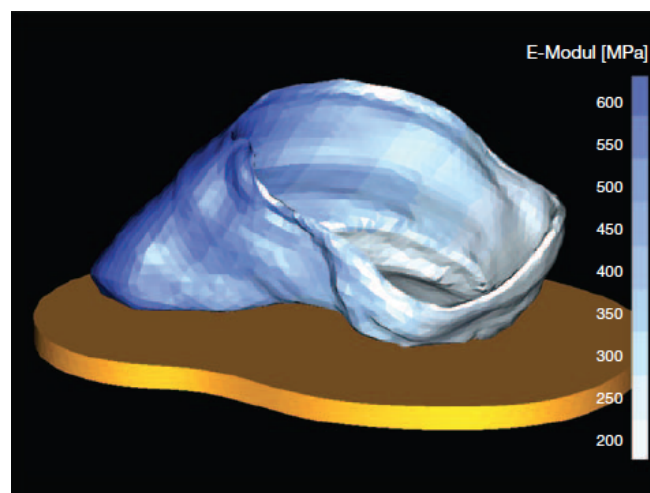


Figure 12 : Modèle par éléments finis d'un onglon bovin. *Les différentes nuances de bleu indiquent différentes valeurs de module d'élasticité. D'après Hinterhofer et al., 2005 [59].*

L'analyse par éléments finis a été utilisée pour évaluer l'impact de différentes conditions du sol et identifier les faiblesses potentielles du modèle sous charge (quasi-) statique [59-61]. Cette technique a permis de visualiser les effets de la charge exercée par différentes surfaces (dure et souple) sur la biomécanique de l'onglon et les effets de la rugosité

des surfaces sur les pressions de contact. Toutefois, ces études ne sont valables que pour un animal en station quadrupède statique.

1.3 L'ulcère de sole

1.3.1 Définition

L'ulcère de sole ou *pododermatitis circumscripta* est une perte de l'épaisseur de l'épiderme (discontinuité macroscopique) et impliquant une partie du chorion. Elle affecte typiquement la zone 4 de la sole (jonction sole-talon), c'est-à-dire la portion adjacente à la tubérosité du fléchisseur de la troisième phalange. L'onglon latéral du membre pelvien est celui le plus souvent affecté par cette pathologie [8, 62].

1.3.2 Pathogénèse et changements structurels

La pathogénèse de l'ulcère de sole s'explique principalement par une contusion du chorion, de la membrane basale et du *stratum basale* de l'épiderme de la sole. La lésion débute à l'intérieur de la boîte cornée et peut être associée à une laxité des fibres de collagène de l'appareil suspenseur [14, 62, 63]. Lors d'une compression excessive du coussinet digital et du chorion de la sole par la tubérosité du fléchisseur de la troisième phalange, œdème et thrombose apparaissent au niveau des vaisseaux sanguins dermiques, associé à une ischémie des tissus (*pododermatitis circumscripta hemorrhagica*) (Fig. 13). Il s'ensuit une altération ou une interruption de la kératogénèse, qui peut évoluer jusqu'à perforation complète de la sole (*pododermatitis circumscripta perforata*).

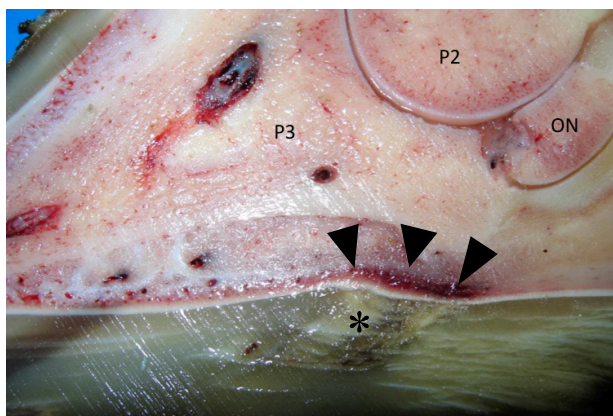


Figure 13 : Pododermatitis circumscripta hemorrhagica. Coupe sagittale, onglon latéral, membre pelvien; P2 phalange moyenne, P3 phalange distale, ON os sésamoïde distal, hémorragie au niveau du chorion (pointes de flèche), altérations de la kératogénèse (*).
Courtoisie de Dr André Desrochers.

L'insulte mécanique menant au développement de l'ulcère de sole peut survenir quand le port de poids sur l'onglon latéral est modifié en raison d'une surcroissance de la corne ou par la surface de stabulation [8, 64]. Selon la théorie exposée par Rusterholz en 1920, largement reconnue encore aujourd'hui, la surcroissance de la corne déterminerait une concentration et un déplacement caudal des forces compressives au niveau de la tubérosité du fléchisseur de la troisième phalange (Fig. 14).

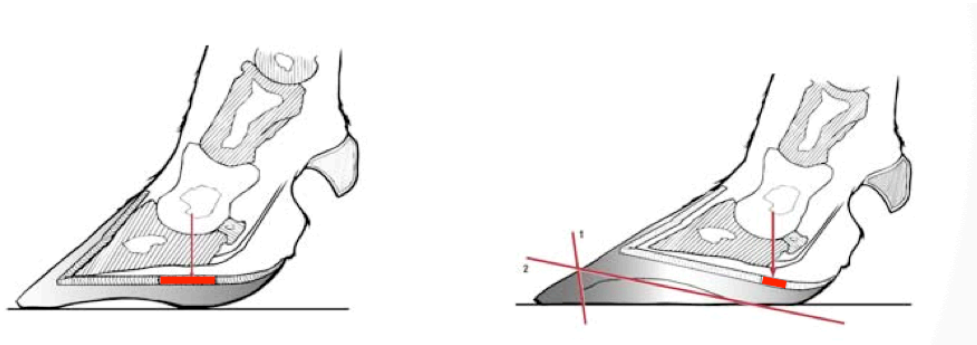


Figure 14 : Déplacement caudal et concentration des forces compressives en cas de surcroissance de la corne. D'après Touissant Raven et al., 1989 [65].

Les charges excessives et répétitives à cet endroit seraient à l'origine de l'ulcère de sole [8]. En appui de cette théorie, Smedegaard, en 1964, a reproduit expérimentalement l'ulcère de sole en utilisant un fer en coin provoquant un déplacement caudal des forces compressives (Fig. 15) [66].



Figure 15 : Induction expérimentale d'ulcère de sole. D'après Smedegaard, 1964 [66].

Une incidence majeure de CHDL a été liée à des altérations des tissus des onglons causées par les surfaces de stabulation dures et abrasives, telles que le ciment, et par la station statique

prolongée sur ces dernières. En fait, à l'opposé des surfaces souples des pâturages, les forces verticales de réaction sont majeures et ne sont pas réparties uniformément lorsque l'animal est logé sur des surfaces dures [57].

À partir des années '70, il a été postulé que l'affaiblissement de l'appareil suspenseur de la troisième phalange en cas de fourbure sous-clinique pourrait expliquer l'apparition des ulcérations de la sole [9, 14, 62]. Il a été supposé qu'une perturbation de la vascularisation du chorion entraînerait des dommages au niveau de la jonction dermo-épidermique, comme décrit chez le cheval. Toutefois, il a été montré que le déplacement de la troisième phalange chez le bovin est vertical, sans rotation. Chez le cheval, les changements à l'origine de l'échec de l'appareil suspenseur de la troisième phalange sont la nécrose et la séparation cellulaire au niveau de la jonction dermo-épidermique, suivie d'une hyperkératinisation des lamelles primaires et une perte des lamelles secondaires [67]. Cependant, la dissociation dermo-épidermique n'a jamais été prouvée chez le bovin; il s'agirait plutôt d'un étirement des lamelles dermiques associé à un détachement de la membrane basale (Fig.16) [10, 11]. Les changements hormonaux physiologiques *peri-partum* semblent influencer sur l'intégrité de l'appareil suspenseur de la troisième phalange via l'activation des MMPs, en particulier MMP2 et MMP9 [14].

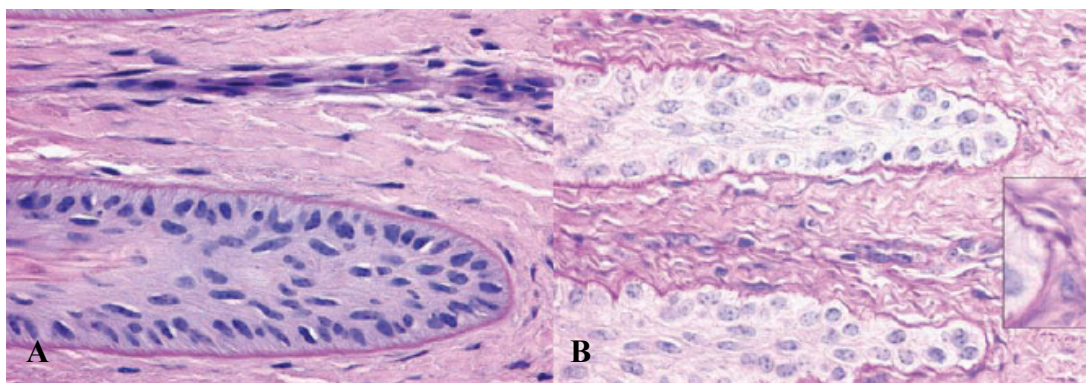


Figure 16 : Jonction dermo-épidermique (lamelles). (a) Onglon latéral, membre pelvien droit, animal contrôle. Membrane basale bien définie, cellules basales en colonne. (b) Onglon latéral, membre pelvien droit, animal 72h après surcharge en oligofructose. Lamelles étirées, membrane basale discontinuée, cellules basales cubiques. D'après Danscher et al., 2010 [11].

Le coussinet digital, et en particulier son épaisseur et sa composition lipidique, est de plus en plus étudié dans la pathogenèse des ulcères de sole [2, 14, 15, 34, 37]. Selon cette

théorie, la perte de gras due au bilan énergétique négatif lors de la période *peri-partum* serait responsable de l'amincissement de cette structure, ce qui entraînerait à son tour une diminution de sa capacité d'amortissement. En appui de cette théorie, plusieurs études ont évalué à l'aide de l'échographie l'épaisseur du coussinet digital et du chorion (appelés dans leur ensemble « tissus mous de la sole ») et ont rapporté une association positive avec le SEC et une corrélation avec le développement des lésions de la boîte cornée de l'onglon, et en particulier l'ulcère de sole [2, 15-18].

1.3.2.1 Changements histopathologiques

L'ulcération de la sole cause une perte d'intégrité de la membrane basale à l'endroit de l'insulte [31]. La *lamina densa* est parfois bosselée et enflée, la *lamina rara* est parfois absente [27].

Les cellules épidermiques deviennent dyskératosiques, résultant en une altération de la synthèse de kératine et du ciment intercellulaire. Par la suite, les cellules épidermiques voisines se séparent à cause du ciment altéré et de la présence d'exsudat inflammatoire (neutrophiles et macrophages). Les kératinocytes du *stratum basale* deviennent vacuolés et pycnotiques. La corne entourant l'ulcère démontre des changements histopathologiques incluant des tubules dilatés, des microfractures se poursuivant dans le *stratum spinosum*, ainsi que des zones nécrotiques [68]. Le contenu cellulaire de kératine est diminué.

Au niveau du chorion, et plus spécifiquement au niveau du *stratum papillare*, les vaisseaux sanguins sont dilatés et thrombosés. Les papilles dermiques sont détachées des tubules épidermiques et présentent une accumulation de neutrophiles et de macrophages. Une prolifération de la *tunica media* des artérioles et une néovascularisation sont aussi évidentes [27, 68]. Le tissu conjonctif du derme est enflé, en particulier à l'apex de la papille dermique.

1.3.3 Signes cliniques et complications

L'ulcère de sole se retrouve en des zones spécifiques qui correspondent aux zones de lésion du chorion de la sole. Le site d'ulcère le plus fréquemment décrit est la zone 4 [8, 62].

Les animaux avec un ulcère de sole peuvent démontrer différents grades de boiterie. Au pourtour de l'ulcère, la surface de la corne solaire est séparée du chorion, exposant ainsi le

chorion au centre du site ulcératif. Ce chorion exposé peut par la suite être endommagé par les rebords du défaut de sole ou par un contact direct avec le sol. Ces traumatismes peuvent résulter en une stimulation cellulaire et la formation subséquente d'un tissu de granulation exubérant (*pododermatitis circumscripta complicata*).

Il n'est pas rare que ces lésions deviennent infectées, impliquant les structures plus profondes de l'onglon (articulation inter phalangienne distale, tendon fléchisseur profond du doigt, bourse naviculaire, gaine des tendons fléchisseurs) (*pododermatitis circumscripta septica*). Lorsqu'un ulcère de sole est compliqué par une infection, l'animal démontre généralement une boiterie plus sévère.

1.3.4 Guérison tissulaire de l'ulcère de sole

Les lésions qui affectent les tissus dermo-épidermiques de l'onglon guérissent par deuxième intention, c'est-à-dire par granulation et épithélialisation. La guérison des ulcères de sole est souvent entravée par l'inflammation/infection des tissus et, le cas échéant, elle tend à être lente.

La guérison tissulaire est un processus complexe et dynamique qui comprend quatre phases se chevauchant : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage [27, 69, 70]. Comparativement à la guérison de la peau, la guérison des tissus cutanés modifiés présente certaines particularités [27]. La contraction de plaie est un élément essentiel à la guérison des lésions cutanées. Elle est toutefois possible seulement si les tissus environnants sont souples et assez extensibles pour le permettre. La structure rigide de la boîte cornée prévient la contraction de la plaie et les myofibroblastes, cellules responsables de la contraction, sont absents au site de l'ulcère de sole [27]. La guérison au niveau de l'onglon survient donc principalement par épithélialisation.

1.3.4.1 Hémostase

La première réponse du chorion à l'insulte mécanique est l'hémorragie. Le sang coagulé et les plaquettes forment un caillot qui scelle la brèche et freine le saignement. Les plaquettes activées sont parmi les premiers promoteurs de l'inflammation. Elles libèrent de leurs granules de stockage de nombreuses cytokines et facteurs de croissance y compris le

facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance transformant beta (TGF- β). Ceux-ci servent de signaux pour initier et amplifier la phase inflammatoire de guérison [69, 70].

1.3.4.2 Inflammation

La phase inflammatoire est caractérisée par le recrutement des leucocytes qui détruisent les débris cellulaires par phagocytose et mécanismes enzymatiques au site de la lésion. Les neutrophiles sont les globules blancs en quantité prédominante au début du processus inflammatoire. Ils seront par la suite rapidement remplacés par les macrophages. Les macrophages sont considérés comme les cellules inflammatoires les plus importantes puisqu'ils sont responsables du débridement au site de la lésion et de la stimulation de l'angiogenèse, de la fibroplasie et de l'épithélialisation.

Si la phase inflammatoire est prolongée, ce qui survient habituellement en cas d'ulcération, la guérison de la lésion sera retardée. Ceci pourrait entraîner la formation d'un tissu de granulation exubérant au site de l'ulcère de sole [71].

1.3.4.3 Prolifération

La phase proliférative est caractérisée par l'apparition du tissu de granulation qui finit par combler le défaut de sole. Ce tissu est formé par les macrophages qui débrident et stimulent l'angiogenèse et la fibroplasie, les fibroblastes qui produisent de nouveaux composés de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que les vaisseaux sanguins qui transportent l'oxygène et les nutriments nécessaires pour la croissance cellulaire [69, 70]. Le tissu de granulation fournit une barrière efficace contre l'environnement mais est toutefois moins résistant que le tissu original.

1.3.4.3.1 Fibroplasie

Les cellules dominant la phase proliférative sont les fibroblastes. Ceux-ci sont responsables de former une MEC riche en collagène de type III. Lorsqu'un tissu de granulation a comblé le site de la lésion, les fibroblastes disparaissent par apoptose cellulaire ou se transforment en myofibroblastes, un phénotype cellulaire impliqué dans la contraction de la plaie.

1.3.4.3.2 Angiogénèse

Les cellules endothéliales jouent un rôle important dans la phase proliférative de guérison. L'angiogénèse qui survient suite à un stimulus hypoxique est un processus médié par de nombreux facteurs de croissance tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2), le PDGF et le TGF- β [69, 70]. Les nouveaux vaisseaux sanguins ainsi formés apportent l'oxygène et les nutriments requis pour la croissance du tissu de granulation. Une fois que le tissu de granulation a comblé le site de la lésion, les nouveaux vaisseaux sanguins disparaissent graduellement. Les échantillons d'ulcères de sole montrent une néoformation des vaisseaux du chorion à partir du 9^{ème} jour [72].

1.3.4.3.3 Épithélialisation

La formation d'une nouvelle corne commence à partir du *stratum basale* qui est en contact direct avec la membrane basale. Les kératinocytes en périphérie de la lésion migrent vers le centre de celle-ci et les kératinocytes de la membrane basale prolifèrent pour reconstituer le front migratoire (hyperplasie épithéliale). Eggers a montré que le site d'ulcère est déjà recouvert par de l'épithélium à partir du troisième jour post-débridement de la lésion [27]. À partir du jour 19, il y a augmentation de la cornification. Toutefois, des zones de dyskératose peuvent être encore présentes une fois l'ulcère guéri [72].

1.3.4.4 Remodelage

La phase de maturation, aussi appelée remodelage, est la dernière étape de la guérison tissulaire. Au niveau de la peau, ce processus mène à la formation d'une cicatrice, ce qui est moins évident au niveau de la boîte cornée de l'onglon. Malgré une guérison dite complète, le site de l'ancien ulcère de sole contient un tissu de remplacement où persistent des changements dyskératotiques, prédisposant aux récives [27, 73, 74].

Le remodelage de la MEC dépend de la présence d'enzymes protéolytiques : les MMPs. Les MMPs sont secrétées sous une forme inactive et sont ensuite activées par clivage protéolytique. MMP2 et MMP9 sont connues pour leur capacité de dégradation du collagène

et leur aptitude à promouvoir le détachement des kératinocytes de la membrane basale, facilitant ainsi leur migration [32].

L'équilibre entre la synthèse et la dégradation du collagène dépend de la présence de MMPs et leurs inhibiteurs, les TIMPs. Lors d'états physiologiques normaux, les TIMPs restreignent l'activité des MMPs et assurent une homéostasie. Un déséquilibre (augmentation de la concentration de MMPs et réduction de celle des TIMPs) peut mener à un retard de guérison et à une incapacité des plaies chroniques à guérir [69, 70]. Cette situation est souvent présente lors d'ulcération; ainsi, la guérison complète d'un ulcère de sole est lente, pouvant durer de 6 à 12 mois [27].

1.3.5 Guérison retardée de l'ulcère de sole

Le temps requis pour la guérison d'un ulcère de sole dépend de plusieurs facteurs tels que la gravité de l'atteinte des tissus. Plus particulièrement, l'habilité de l'épithélium à se régénérer dépend de la perfusion du chorion au niveau de la lésion. Lorsque le chorion présente un dommage sévère, l'intégrité de la membrane basale et l'adhésion de l'épiderme à cette dernière sont perdus au site d'ulcère. Le rattachement entre le nouvel épiderme et la membrane basale est indispensable à la guérison complète. Lors d'altérations importantes du chorion, la formation d'une nouvelle couche de corne au site d'ulcère peut nécessiter jusqu'à 40 jours [75].

L'application de bandages au niveau des lésions d'ulcère de sole semble retarder leur guérison, en favorisant le développement de tissu de granulation exubérant [76]. Van Amstel *et al.* ont observé que les ulcères présentant une quantité excessive de tissu de granulation guérissent plus lentement. La guérison, définie comme la formation d'une couche de corne complète, peut nécessiter jusqu'à 60 jours (étendue 41-60 jours) si du tissu de granulation exubérant est présent, comparé à 12 à 28 jours pour des lésions sans tissu de granulation exubérant [74]. La guérison de plaie retardée et la production de tissu de granulation exubérant ont été rapportées chez le cheval suite à l'utilisation des bandages au niveau distal des membres [77, 78]. Cette formation anormale de tissu peut être une conséquence d'une tension réduite en oxygène au niveau de la surface de la lésion sous le bandage [79, 80].

1.3.6 Gestion clinique de l'ulcère de sole

L'une des considérations les plus importantes lors du traitement de l'ulcère de sole est l'application d'une talonnette orthopédique sur l'onglon sain afin de diminuer le poids déposé sur l'onglon affecté [73, 81]. Cela procure un soulagement de la douleur et semble avoir un effet bénéfique sur la condition du chorion et la formation d'un nouvel épiderme, probablement en relation avec la réduction du stress mécanique sur le chorion même [82]. Aux stades précoces, l'amincissement du talon de l'onglon affecté permet un transfert du poids à l'onglon sain suffisant pour que la guérison ait lieu.

La corne entourant l'ulcère est souvent nécrotique et détachée du chorion, ce qui peut résulter en l'infiltration de saletés. Le parage correctif prévoit l'excision de cette corne nécrotique à un angle de 45° jusqu'à ce qu'une mince couche de corne saine soit présente autour de la circonférence de l'ulcère. Si du tissu de granulation exubérant est présent, il doit être excisé. L'application d'agents caustiques pour réduire le tissu de granulation exubérant est contrindiqué car il peut retarder la guérison de l'ulcère en raison de l'interférence avec la croissance des kératinocytes et de la réponse inflammatoire chronique que cela provoque [73]. Quand le parage correctif est réalisé avec soin pour éviter d'endommager le chorion sain, la guérison de l'ulcère est plus rapide [83].

2. Problématique

Les ulcères de sole sont une maladie dont l'impact peut être dévastateur chez les élevages de vaches laitières. Depuis des décennies, les chercheurs tentent de comprendre la pathophysiologie de cette lésion afin de la prévenir. Cependant, la recherche est encore loin d'avoir trouvé la réponse et surtout la stratégie de prévention optimale.

Certains chercheurs pensent que le coussinet digital est fortement impliqué dans l'apparition de l'ulcère de sole chez la vache laitière. Toutefois, aucune étude n'a regardé les propriétés biomécaniques de ce coupable présumé à ce jour. Il devient donc important de les décrire afin d'obtenir une meilleure compréhension de cette lésion du pied bovin dans le but ultime de faire progresser la recherche d'une stratégie de prévention efficace.

3. Hypothèses et objectifs

➤ Hypothèses

- ❖ Les tissus mous de la sole exhiberont un comportement viscoélastique en réponse à une compression, générant ainsi une pression hydrostatique.
- ❖ Les tissus mous de la sole, provenant d'onglons ulcérés, montreront une réduction de la résistance viscoélastique à la compression (augmentation de la rigidité et diminution de la perméabilité), et cela en corrélation avec l'âge, le poids, le score d'état corporel (SEC), les jours en lait (JEL), la rigidité de la corne et l'anatomie microscopique des tissus.

➤ Objectifs

L'objectif général du projet est de documenter les propriétés biomécaniques des tissus de la sole afin de mieux comprendre le développement des ulcères de sole chez les bovins laitiers, dans le but ultime de pouvoir mettre en œuvre des stratégies efficaces de prévention et de traitement. Plus spécifiquement, le projet vise à :

- ❖ Évaluer le comportement mécanique des tissus mous de la sole en réponse aux essais de relaxation de contrainte en compression non confinée chez des onglons bovins sains et ulcérés.
- ❖ Évaluer le comportement mécanique de la corne de la sole en réponse à une compression uni axiale chez des onglons bovins sains et ulcérés.
- ❖ Montrer que l'âge, le poids, le SEC et les JEL affectent le comportement mécanique des tissus de la sole chez des onglons bovins sains et ulcérés.
- ❖ Décrire l'aspect microscopique des tissus de la sole, chez des onglons bovins sains et ulcérés.

4. Aspects méthodologiques et résultats préliminaires

Cette étude préliminaire avait pour but de déterminer les paramètres des tests biomécaniques et la procédure utilisée pour la préparation des lames histologiques.

Cinq pieds pelviens ont été récoltés de vaches laitières de race Holstein euthanasiées pour des raisons autres que cette étude. Les pieds ont été nettoyés et la surface solaire parée. Basé sur une observation macroscopique, les onglons latéraux ont été classifiés comme sains ou ulcérés. Ont été définis comme onglons ulcérés ceux montrant un défaut de la corne au niveau du site typique de l'ulcère (zone 4 de la carte internationale du pied) avec ou sans exposition du chorion ou du tissu de granulation. Tous les pieds montrant une maladie infectieuse telle que la dermatite digitale, ou non-infectieuse autre qu'un ulcère de sole (fissure de la muraille, maladie de la ligne blanche, érosions en talon) ont été exclus de l'étude. Les onglons latéraux ont été séparés avec une scie à ruban et congelés à -20°C [84, 85]. Par la suite les zones 4 et 6 ont été identifiées et deux échantillons de 8mm de diamètre ont été prélevés de chaque zone à l'aide d'un poinçon artisanal (Fig.17). Le poinçon présente 12 petites dents tranchantes et divergentes vers l'extérieur (Fig.18) et il est utilisé en rotation à l'aide d'une perceuse à faible vitesse (250 tr/min) et sur tissus congelés afin de prévenir les traumatismes dus à la chaleur. Chaque échantillon cylindrique était composé d'environ 3 mm d'os cortical de la troisième phalange, de l'épaisseur complète des tissus mous (chorion et coussinet digital), et de la corne de la sole. Un des deux échantillons de chaque zone était assigné aléatoirement soit aux tests mécaniques soit à l'analyse histologique.

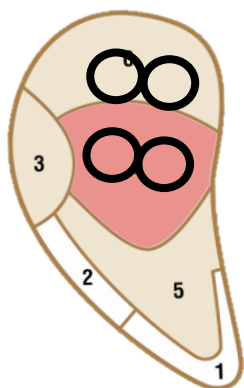


Figure 17 : Zones de prélèvement des échantillons.



Figure 18 : Poinçon artisanal.

4.1 Biomécanique

Les échantillons pour les tests mécaniques étaient entreposés individuellement à -20°C enveloppés dans une compresse humide dans un contenant en plastique hermétique pour prévenir la déshydratation. Lors des tests, les échantillons étaient décongelés à température ambiante pour 12h et les tissus mous isolés de l'os et de la corne avec une lame de bistouri.

Il a été décidé de procéder avec des tests en compression puisque *in vivo* les tissus de la sole subissent des forces compressives.

4.1.1 Relaxation de contrainte

Les tests biomécaniques pour les tissus mous étaient réalisés avec une machine micromécanique (Mach-1, modèle MA410, Biomomentum, Biomomentum Inc., Laval, QC, Canada) (Fig.19).

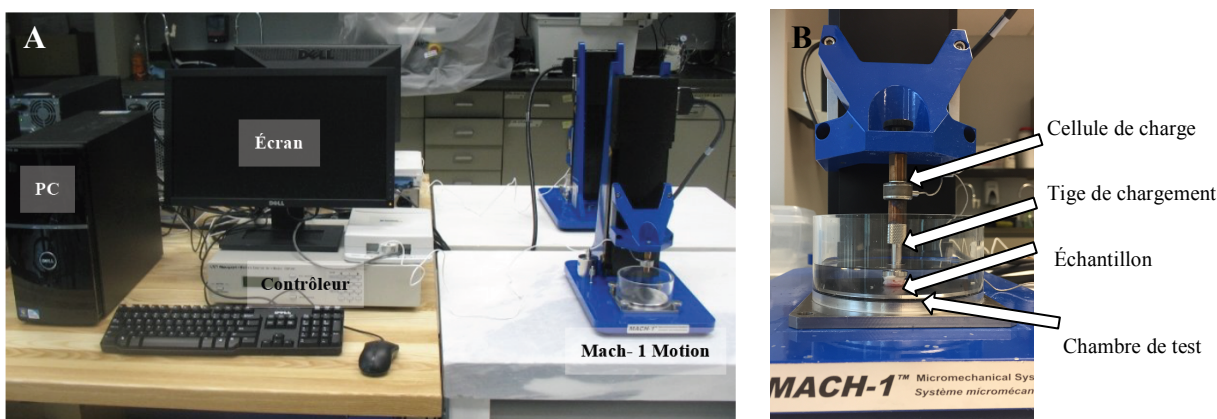


Figure 19. Appareillage utilisé pour les tests de relaxation de contrainte en compression pour les tissus mous (A) ; échantillon à l'intérieur de la chambre de test remplie de solution saline tamponnée au phosphate (PBS), comprimé par la tige de chargement reliée à la cellule de charge 10N (B).

Les échantillons étaient pré-chargés à un taux de déformation de 5% et ensuite soumis à des tests de relaxation de contrainte en série à un taux de déformation de 5% et ceci, jusqu'à 50% de déformation. Chaque point de contrainte à l'équilibre était transféré sur un graphique contrainte/déformation afin d'identifier la portion de déformation linéaire des tissus (Fig.20). Le taux de déformation linéaire moyen était de 20%.

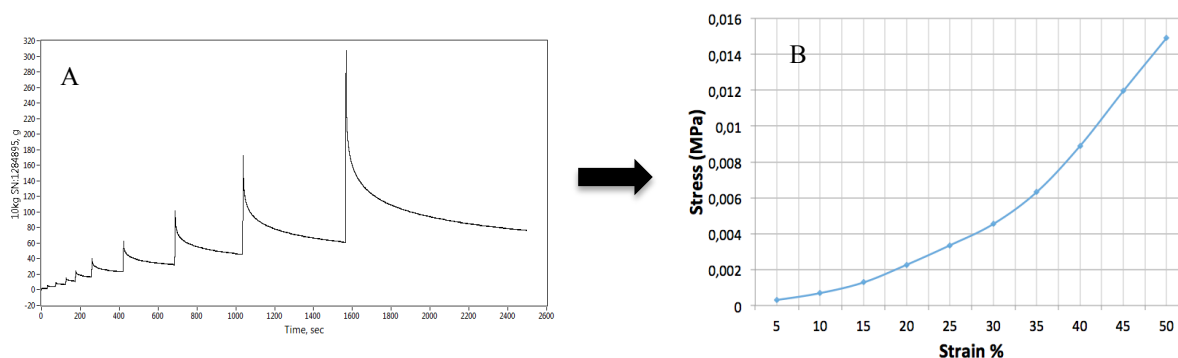


Figure 20 : Choix du taux de déformation. *Test de relaxation de contrainte en série (5 à 50 % de déformation) décrit comme force vs temps (A); graphique contrainte-déformation correspondant (B).*

Une analyse graphique a été réalisée pour déterminer la vitesse de déformation (de $0,0015 \text{ s}^{-1}$ à $0,015 \text{ s}^{-1}$), ainsi que le critère de relaxation (de $0,025 \text{ g/min}$ à $0,05 \text{ g/min}$). Selon les résultats de l'étude préliminaire, les paramètres choisis pour les tests expérimentaux étaient: pré-charge avec un taux de déformation de 5%, suivi d'une compression constante avec un taux de déformation de 20%, à une vitesse de déformation de $0,015 \text{ s}^{-1}$; le critère de relaxation était fixé à $0,025 \text{ g/min}$.

4.1.2 Compression uniaxiale

Les tests biomécaniques pour la corne de la sole de l'onglon ont été réalisés avec une machine micromécanique (MTS/Insight 50; plage de charge 50kN). Les échantillons étaient testés en compression jusqu'à échec, après une pré-charge de 50N et à une vitesse de 1 mm/min [49, 50]. Le module d'élasticité (E) a été extrait pour chaque échantillon de la partie linéaire de la courbe contrainte vs. déformation obtenue. La teneur en matière sèche (DMC) n'était pas prise en compte.

4.2 Histologie

Les échantillons pour l'évaluation histologique ont été fixés dans une solution tamponnée de formol 10% pour un minimum de 48 heures. La coupe au microtome des tissus durs tel que l'os et la corne nécessite un traitement chimique afin de « ramollir » ces tissus. Le Rapid Decalcifier RDO®, dont l'acide hydrochlorique est le principal composant, a été choisi comme produit décalcifiant. La détermination du point de décalcification optimale a été

réalisée en évaluant la flexibilité de l'os toutes les 2 heures, comme suggéré par le fabricant; ceci a été fixé à 24 heures. Dans un premier temps, la morphologie des tissus sur lames colorées avec hématoxyline-éosine après soit immersion complète de l'échantillon dans le RDO, soit après immersion de l'os seulement, a été comparée. Une perte des propriétés basophiles des tissus a été remarquée avec l'immersion complète de l'échantillon dans le RDO. Il a donc été décidé d'immerger seulement l'os dans la solution décalcifiante en prenant soin que cette dernière ne touche pas aux tissus mous. L'hydroxyde de sodium a été choisi pour dé-kératiniser la corne et permettre la coupe au microtome. Encore une fois, les échantillons ont été vérifiés toutes les 2 heures afin de déterminer la flexibilité de la corne à la coupe. Le temps du traitement avec l'hydroxyde de sodium a été fixé à 24 heures.

Afin d'évaluer la morphologie microscopique des tissus, ainsi que de juger le contenu en collagène, deux colorations ont été choisies. Bien que la coloration hématoxyline-éosine (H&E) soit couramment utilisée en histopathologie pour évaluer la morphologie des tissus, une coloration hématoxylin phloxine saffron (HPS) modifiée (avec l'ajout d'éosine) a été choisie afin d'assurer une bonne différenciation du collagène (rouge) du cytoplasme (rose). De plus, une coloration spéciale pour les composants de la MEC dont le collagène, la coloration Picrosirius Red (PSR), a été utilisée. L'utilisation de cette coloration était basée sur l'objectif de réaliser une analyse quantitative morpho-métrique des fibres de collagène de type I et III, en supposant que les tissus ulcérés contiendraient plus de fibres de collagène de type III que de type I lorsque comparés avec les tissus sains. Quand les tissus colorés avec le PSR sont évalués avec un microscope à lumière polarisée, les fibres de collagène de type I montrent une biréfringence jaune-rouge, tandis que les fibres de collagène de type III sont vertes et moins biréfringentes [86]. La procédure et les colorations ont été testées sur les échantillons de l'étude préliminaire. Ces mêmes échantillons ont été utilisés pour définir la grille d'évaluation des lames histologiques.

Une échelle d'évaluation à 5 degrés, précédemment publiée [68], a été adaptée aux échantillons de l'étude préliminaire. Dans l'étude précédemment citée seulement le chorion et une partie de l'épiderme (épaisseur partielle du *stratum corneum*) étaient récoltés du site typique de l'ulcère de sole et les tissus colorés avec une coloration acide phosphotungstique-hématoxyline (PTAH). Mochizuki *et al.* ont créé 5 grades dont le grade 1 correspondait à des

tissus normaux avec papilles épidermiques régulières et anomalies vasculaires (distension, congestion et vacuolisation des parois vasculaires) très rares. Les tissus classifiés comme grade 2 montraient des papilles irrégulières, occasionnels corps de kératine au niveau du *stratum spinosum* et vacuolisations au niveau du *stratum basale*, fibrose et inflammation légère du chorion et anomalies vasculaires légères. Le grade 3 était caractérisé par parakératose et hyperkératose et anomalies vasculaires modérées incluant la présence de thrombi ; le grade 4 était caractérisé par cornification et nécrose épithéliale et anomalies vasculaires fréquentes. Dans le grade 5 il y avait absence du *stratum corneum* et infection du chorium avec haute incidence d'anomalies vasculaires. Suite à l'évaluation des tissus de l'étude préliminaire une grille d'évaluation à 4 degrés, qui tenait compte de l'épaisseur totale de la couche germinale ainsi que la forme et le patron des papilles épidermiques, la présence de dyskératose, spongieuse (œdème intercellulaire), anomalies vasculaires, minéralisation des tissus mous, ostéophytes, l'organisation du collagène et la proportion du tissu adipeux, a été produite. L'évaluation des lames colorées avec PSR a montré l'impossibilité de procéder à l'analyse quantitative morpho-métrique des fibres de collagène de type I et III. Selon l'orientation des fibres de collagène et des tissus sous la lumière polarisée, il y avait une variation de la biréfringence et un changement de couleur qui empêchait de définir avec certitude le type de fibre. La coloration PSR n'a donc pas été évaluée dans l'étude principale.

5. Article scientifique

5.1 Corps

***In vitro* biomechanical properties of sole tissues: comparison between healthy and ulcerated bovine claws**

E. Marchionatti,^{*1} A. Desrochers,[†] N. Wenzlow,[‡] I. Villemure,[§] and C. L. Theoret^{*}

^{*}Department of Veterinary Biomedicine, and

[†]Department of Clinical Sciences, and

[‡]Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint Hyacinthe, Canada

[§]Department of Mechanical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, Canada

ABSTRACT

Sole ulcers are reported to be one of the most prevalent diseases associated with lameness in dairy cattle, significantly affecting animal welfare and farm profitability. The degree to which sole tissues, healthy or ulcerated, are able to maintain their structure and function when subjected to compressive forces remain unknown. Therefore, the aims of the present study were to assess sole tissues biomechanics in healthy and ulcerated claws; to evaluate whether age, body weight (BW), body condition score (BCS) or days in milk (DIM) affect mechanical behavior; and to describe correlated histology. Cylindrical samples were harvested from zones 4 and 6, as described by the international foot map, from hind lateral healthy and ulcerated

bovine claws. Tissue biomechanics and morphology were evaluated performing compressive tests and hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HPS) stains, respectively. A t test for two means comparisons was used to compare zones' mechanical properties between healthy and ulcerated tissues, while a linear mixed model was chosen to assess association of independent variables and a Cochran-Mantel-Haenszel test to measure the effect of claw zone on histology. BCS had a positive and significant effect on sole soft tissue thickness, which was significantly higher in zone 6 compared to zone 4, but the effect was the same for healthy and ulcerated claws. The fibril modulus (E_f) and permeability (k) were statistically significantly greater in ulcerated claws compared to healthy claws only for zone 6. There was a positive and significant effect of increasing DIM on fibril modulus (E_f). Histology scores equal to or greater than 3 were associated with macroscopic presence of ulceration. Higher proportion of adipose tissue (30% and more) was associated with zone 6 compared to zone 4, but no difference was seen between healthy and ulcerated claws. Ulcerated claws had a higher prevalence of osteophytes compared to healthy ones. Sole soft tissues showed, as hypothesized, a viscoelastic behavior, however it was not possible to prove associations with independent variables. Moreover, clinical and histological signs of sole ulceration were not associated with decreased strength of the supportive apparatus of the third phalanx in zone 4 in this study.

Key words: dairy cow, lameness, biomechanics, histology, supportive claw apparatus, sole horn.

INTRODUCTION

Lameness is one of the most important welfare issues in modern dairy industry worldwide, with growing concern among the general public. Claw lesions have long been

recognized as the leading cause of lameness in dairy cattle [1]. Among claw horn disruption lesions (CHDL), sole ulcers are reported to be the most prevalent disease associated with lameness [1, 3, 87], significantly affecting animal welfare and farm profitability [5, 7, 88].

Despite their undeniable importance, little is yet known about the etiology and pathophysiology of sole ulcers. Nowadays it is widely accepted that sole ulcers are a consequence of contusions of the corium and germinal epithelium of the sole commonly at the level of the flexor tuberosity of the distal phalanx within the horn capsule. Ultimately, disturbances in the microvasculature of the compressed area of the corium lead to ischemia, hypoxia, disruption of keratinization and, eventually, sole horn perforation [31, 68, 89].

Although it is suggested that sole ulcers are caused by subclinical laminitis [9, 12, 90], there is limited evidence to support this theory in dairy cattle [10, 14, 91]. In contrast to horses, laminitis in dairy cattle appears to be primarily a degenerative rather than an inflammatory process, since dissociation between laminar corium and horn leaflets has never been demonstrated, nor has the presence of signs of repair such as hyperkeratosis and thickening of epidermal leaflets. Laminitis in cattle is, rather, a stretching of the dermal lamellae [10, 11, 14]. The physiological hormonal changes occurring around calving appear to affect the integrity of the distal phalanx suspensory apparatus via activation of matrix metalloproteinases (MMPs), resulting in an increase in the elasticity of collagen fibers, thus allowing the distal phalanx to sink within the horn capsule [13, 92].

The digital cushion, which is a modified layer of subcutis situated beneath the distal phalanx, was only recently investigated in more detail [15, 17, 34]. Composed of adipose and connective tissue, it is considered important in dampening compression and dissipating forces at the beginning of the stance phase [26], thus protecting the corium and germinal epithelium

under the distal phalanx [14, 34]. Thickness of the digital cushion beneath the flexor tuberosity of the distal phalanx has been investigated in several studies using ultrasonography [2, 15-17]. Bicalho et al. (2009) and Newsome et al. (2017) reported a positive association between digital cushion thickness and body condition score (BCS) or back fat thickness, respectively [15, 17]. Moreover, digital cushion thinning appeared to predispose to subsequent CHDL [2, 16, 17].

The degree to which sole soft tissue (digital cushion and corium), healthy or ulcerated, is able to maintain structure and function when subjected to compressive forces remains unknown. The link between tissue thickness and mechanical properties is also not clearly determined. Knowledge of the biomechanical properties of claw sole tissues will provide a basis for an improved understanding of the pathogenesis of lesions and, possibly, for treatment and prevention strategies.

Therefore, the objectives of the present study were (1) to assess sole soft tissue mechanical behavior in response to compression in healthy and ulcerated bovine claws, (2) to describe sole horn mechanical behavior in response to compression in healthy and ulcerated bovine claws, (3) to evaluate whether age, body weight (BW), BCS or days in milk (DIM) affect sole tissues' mechanical behavior, and (4) to describe the corresponding histology. We hypothesized that sole soft tissue (digital cushion and corium) and sole horn would exhibit a viscoelastic behavior in response to compressive loading. Additionally we hypothesized that sole soft tissue from ulcerated claws, when compared to healthy claws, would show increased rigidity and decreased permeability, leading to reduced viscoelastic compression-resistance capacity, in correlation with advancing age, increasing BW, BCS and DIM. Likewise we hypothesized that sole horn from ulcerated claws, when compared to healthy claws, would

show decreased elastic modulus in correlation with advancing age, increasing BW, BCS and DIM. Moreover, we hypothesized that biomechanical changes would be correlated to histological abnormalities.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Preparation

Hind feet were harvested from mature Holstein dairy cattle subjected to euthanasia for reasons unrelated to this study. As such, institutional animal care and use committee approval was not required. Information on age, BW, BCS and stage of lactation was obtained from medical records. All feet were cleaned and the solar surface trimmed and observed for macroscopic abnormalities. Lateral claws were categorized as healthy (n=12) or ulcerated (n=8). Healthy claws were defined as having intact sole after trimming and being devoid of infectious lesions such as digital dermatitis, and horn diseases including wall abnormalities, solar hemorrhages, white line disease and heel-horn erosions. Ulcerated claws were defined as presenting a sole horn defect at the typical site (zone 4, as described by the international foot map) with or without exposure of the corium or of granulation tissue. Lateral claws of each hind foot were separated with a band saw and frozen. Then, zones 4 and 6, as described by the international foot map, of each claw were identified and two samples (8 mm diameter) were obtained from each zone by cutting the frozen tissues with a hand-made biopsy punch. Samples from zone 6 were used as negative controls since this zone is normally exempt of sole ulcers. Each cylindrical sample was composed of approximately 3 mm of cortical bone of the distal phalanx, the full-thickness of digital cushion and corium (sole soft tissues), and the sole horn (Fig.1). One of the two samples from each zone was randomly assigned to either mechanical testing or histological evaluation. Samples for mechanical testing were wrapped in

a 4x4 in gauze moistened with 3ml of saline solution and individually stored in small sealed plastic containers to prevent dehydration. Samples were kept at -20°C for a maximum of 30 days prior to mechanical testing.

Mechanical testing

Samples for mechanical testing were allowed to thaw at room temperature for 12 hours. Sole soft tissues were isolated from bone and horn using a scalpel blade. Two types of mechanical tests were completed: soft tissues (digital cushion and corium) underwent stress relaxation test under unconfined compression and horn tissues underwent uniaxial compression until failure. For soft tissues, testing was performed in a hydrated environment at room temperature using a micromechanical testing system (Mach-1, model MA410, Biomomentum, Biomomentum Inc., Laval, QC, Canada; load range 10N). The cylindrical sample was placed between the two impermeable platens allowing for its lateral expansion, in a cylindrical bath filled with phosphate-buffered saline (PBS) to maintain hydration during testing. The distance between the platens was recorded electronically (sample thickness). Loads were recorded with a load cell, whose range and resolution were, respectively, 10 and 0.5 mN. Axial displacements were controlled via an encoder of 100 mm range and 0.5 mm resolution. After an initial pre-strain at 5% strain, samples were loaded at 20% strain at a strain rate of $1.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. A relaxation criterion of 0.025 g/min was used to allow samples to reach equilibrium. For each sample, stress relaxation curves were recorded from which the maximum compressive stress (σ_{\max}) was located at the time at which the applied 20% maximum strain was reached, and the equilibrium stress (σ_{eq}) upon reaching the relaxation criterion. The matrix equilibrium modulus (E_m) was directly evaluated based on the applied strain and relaxed stress values obtained from the experimental curves. The fibril-network

reinforced biphasic model [93] was fitted to the data to obtain the fibril modulus (E_f) and permeability (k) using the Mach-1 analysis software (Biomomentum Inc.).

Horn samples were subjected to a uniaxial compression test under controlled displacement in a quasi-static condition at 1 mm/min until failure. Prior to compression, samples were preloaded at 50 N to ensure good contact between the sample and the smooth platens. Compression tests were performed at room temperature using a micromechanical testing system (MTS/Insight electromechanical testing system 50; load range 50 kN (resolution of 2.5 kN); displacement range: 1100 mm (resolution of 0.001 mm)). The distance between the platens and the compression force were recorded electronically. For each sample, stress (force over sample cross-sectional area) vs strain (displacement over tissue thickness) curves were recorded from which the elastic modulus (E) was extracted at 20% of strain.

Histology

Samples for histological evaluation were fixed in 10% buffered formalin solution for at least 48 hours and subsequently decalcified in Rapid Decalcifier (RDO) (Apex, Aurora, IL, USA) and de-keratinized in 10% NaOH, then embedded in paraffin. Three μm thick sections were mounted on glass slides and stained with hematoxylin-eosin-phloxine-saffron (HPS) stain following standard technique.

Samples for histology were evaluated, in a blind fashion, by two of the authors (NW, trained pathologist, and EM). A 4-grade evaluation system where grade 1 was considered normal was adapted from the 5-grade scale formerly reported by Mochizuki et al. (1994) [68] and was based on the severity of epidermal, microvasculature, and collagen abnormalities (Tab.1; Fig.2). Epidermal and dermal papillae were evaluated for their shape and pattern as regular or flattened and irregular. The living epidermal thickness was described as normal or

decreased (epidermal atrophy). Dyskeratosis, defined as abnormal keratinization occurring prematurely within groups of cells in the suprabasal layers, and spongiosis, defined as intercellular edema, were classified as absent, mild, moderate or severe. Microvasculature abnormalities were defined as thrombosis, dilation, endothelial hypertrophy or increased number of dermal vessels and classified as absent, mild, moderate or severe. Collagen was described as organized or disorganized and dense with or without basophilic degeneration.

In addition, the degree of soft tissue mineralization, the presence or absence of osteophytes and the proportion of adipose tissue were assessed. Soft tissue mineralization was classified as absent, mild, moderate or severe and the proportion of adipose tissue categorized from 1 to 5 where 1 was <10%, 2 between 10% and 30%, 3 between 30% and 50%, 4 between 50% and 75%, and 5 >75% of the dermis/subcutaneous tissue.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using SAS 9.2. Data sets were tested for normality and homogeneity and logarithm transformation was applied when needed. A *t* test for two means comparison was used to compare mechanical properties of each zone between healthy and ulcerated claws. A linear mixed model was used to assess the association between mechanical properties and independent variables. Independent variables included age, BCS, BW, DIM, claw zone and macroscopic appearance. A Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) test for repeated measures was used to evaluate the effect of the claw zone and macroscopic appearance on histology grade, proportion of adipose tissue and presence of osteophytes. Results were considered significant with a $p < 0.05$.

RESULTS

Twenty lateral hind limb claws were harvested from 12 mature Holstein dairy cows with a mean age of 6.5 years old \pm 2 years, a mean BW of 636 kg \pm 90 kg, a mean BCS of 3.5 \pm 0.5 and a median DIM of 16 days (range 3 to 305 days). Claws were categorized as healthy (12) or ulcerated (8) based on macroscopic evaluation after trimming. BCS in the healthy group was 3.46 \pm 0.25 compared to 3.44 \pm 0.4 of the ulcerated group.

Sole soft tissue (digital cushion and corium) thickness was significantly higher in zone 6 (7.40 mm \pm 0.25 mm) compared to zone 4 (6.14 mm \pm 0.25 m) ($p=0.004$), but the effect was the same for both healthy and ulcerated claws ($p=0.79$). The mixed linear model showed a positive and significant effect of BCS ($p=0.009$), but not of age, BW or DIM, on sole soft tissue thickness. Horn thickness after trimming was not related to claw zone (zone 4: 6.04 mm \pm 1.74 mm; zone 6: 6.35 mm \pm 1.68 mm), macroscopic appearance, age, BCS, BW or DIM.

Mechanical properties

A typical experimental stress relaxation curve for sole soft tissue and a typical uniaxial compression curve for sole horn are presented in Figure 3. The corresponding fibril-network reinforced biphasic curve showed good agreement with the experimental data of the stress relaxation tests (Fig. 3).

Data for mechanical properties are presented in Table 2. Data from 3 healthy samples for zone 6 and 1 ulcerated sample for zone 4 were excluded from the statistical analysis because of aberrant values. The t test for two means comparison showed that only the fibril modulus (E_f) and the permeability (k) were significantly greater in ulcerated claws compared to healthy claws for zone 6 ($p= 0.03$). All other tested mechanical properties were not statistically different between healthy and ulcerated claws for either claw zone. The mixed linear model

showed a positive and significant effect of increasing DIM on fibril modulus (E_f) ($p=0.01$). There were no other significant effects of age, DIM, BW or BCS on any other mechanical property studied and mean values were not influenced by the claw zone or the presence of sole ulceration.

Histology

Samples for histology were classified as grade 1 ($n=11$), 2 ($n=13$), 3 ($n=13$) or 4 ($n=3$). The CMH test indicated association between histology scores equal to or greater than 3 and macroscopic presence of ulceration ($p=0.005$). Higher proportion of adipose tissue (30% and more) was associated with zone 6 compared to zone 4 ($p=0.008$), but no difference in the proportion of adipose tissue was seen between healthy and ulcerated claws. Ulcerated claws had a higher prevalence of osteophytes (33%) compared to healthy ones (8%) ($p=0.04$).

DISCUSSION

Despite macroscopic and histological signs of sole ulceration, only some differences in mechanical properties of sole soft tissue and sole horn between healthy and ulcerated claws could be demonstrated in the present study. Similar results were reported by Danscher et al. (2010), where oligofructose overload caused histological signs of laminitis, but no decrease in the strength of the suspensory apparatus of the claw within 72 hours of overload [11]. In that study, the authors suggested that mechanical weakening of the suspensory apparatus might be delayed relative to the onset of histological changes. In the current study, no information was available on previous trimming and possible presence of claw lesions, thus the chronicity of the lesions could not be assessed. Therefore, it is possible that the ulcerated claws used in the current study were in healing process and that, consequently, no differences in mechanical properties could yet be detected when compared to healthy claws for zone 4. Soft tissue

mineralization and presence of osteophytes observed histologically in some of the ulcerated samples do suggest chronicity. Moreover, biological tissues are composed of different material with specific mechanical properties, meaning that the mechanical properties may vary from one point to another inside the same tissue. Our test samples were of small diameter and may thus not be representative of the entire tissue structure.

As hypothesized, the fibril network modulus (E_f) and the permeability (k) of the sole soft tissue were significantly increased and decreased, respectively, in ulcerated claws compared to healthy tissues. However, this was true only for zone 6. A similar trend could be identified also for zone 4, although it was not statistically significant. The increased fibril modulus, which quantifies the material's resistance to elastic tensile deformation, and the decreased permeability in ulcerated claws may both be explained by the dense packing of collagen fibers in ulcerated soft tissues. Previous studies on cartilage mechanical properties have shown that there is a decrease in the fibril modulus associated with a higher permeability following collagen degradation that can be related to the sparse packing of collagen fibrils resulting in a decreased resistance to fluid flow [93]. It has also been suggested, in human patients, that excessive loading and repetitive stress concentration may tear collagenous fibers and decrease the integrity of the fatty chambers of the heel pad, ultimately altering the mechanical behavior of the tissue [94]. This process may also be involved in sole ulcer pathogenesis in cattle, but further histological and mechanical studies are warranted.

As hypothesized, sole soft tissue of the bovine claw behaved as a viscoelastic material showing stress relaxation, typical of biologic soft tissues. Viscoelasticity implies an initial elastic deformation followed by a time-dependent viscous deformation until equilibrium is reached. Stress relaxation describes how tissues relieve stress under constant strain and

depends on deformation magnitude and rate. Deformation applied to the tissues was defined in a non-destructive range (20% strain), which simulates physiological circumstances. Unconfined compression is the technique traditionally employed to measure mechanical characteristics of soft tissues and was thus used in this study. The digital cushion is a complex structure composed of collagenous elements connecting the third phalanx to the dermis and epidermis, compartmentalizing the fat of the digital cushion, and enclosed in a semi-confined environment, the horn claw capsule. Confined compression testing configuration might therefore be more similar to the *in vivo* loading state of the sole soft tissue, but concerns due to friction may arise in this case. The results presented in this study suggest that unconfined compression, together with the application of the fibril-network reinforced biphasic model, is a suitable technique for assessing mechanical properties of sole soft tissue in bovine claws. It must be noted, however, that other mathematical models may be more suited to the characterization of claw soft tissue, such as the visco-hyperelastic model used to predict the mechanical behavior of the human heel pad [36, 43].

The effect of freezing the samples, as well as the temperature at which mechanical tests were performed in the present study, must be taken into consideration. No data are available regarding the effect of freezing on the mechanical properties of the supportive apparatus of the bovine claw. Boettcher et al., (2014) and Tarlton and Webster (2000) reported that sample storage at either -18°C or -20°C had no effect on biomechanical strength (Young's modulus) of the suspensory tissue in bovine claws, when compared to fresh samples [84, 85]. Equally, Bennet and Ker (1990) showed similar mechanical properties between human heel pads tested within 1 hour from harvesting or after frozen storage (temperature not specified) [95]. However, it has been shown that freezing may negatively impact mechanical properties

measured in other viscoelastic soft tissues, in other animal species [96]. All mechanical tests were performed at room temperature in the present study. Fat pads are presumably structured to ensure their properties are optimal at normal body temperature. Consequently, the lower room temperature at which tissues were tested might influence the viscoelastic properties of these tissues, such that present results may not be true *in vivo*. Furthermore, it has been shown that *in vitro* and *in vivo* mechanical testing of the human heel pad yields different results in terms of stiffness and energy dissipation, which are primarily explained by the influence of the entire lower leg in *in vivo* tests [97]. Thus, results presented here must be interpreted cautiously.

We were not able, in the present study, to show a difference in the sole horn elastic modulus between healthy and ulcerated claws. Previous studies testing sole horn under similar conditions have shown a marked reduction in the elastic modulus of sole horn of claws affected by chronic laminitis [50]. Moreover, sole horn elastic modulus values registered in the present study are more similar to those reported by Franck et al. (2006), than to those reported by Hinterhofer et al. (2005 and 2007) [48-50]. Yet, it must be noted that horn humidity and dry matter content were not taken into account in this study.

Unfortunately, no information was available regarding housing of the animals enrolled in the present study. More than 90% of Quebec's dairy farms are based on tie-stalls (www.dairyinfo.gc.ca). Although no data are available for adult dairy cows, Gard et. al (2015) stated that exercise and terrain may increase the volume and surface area of the digital cushion of the feet of dairy calves, thus reducing the prevalence of lameness associated with CHDL [98]. It would appear, intuitively, that the prevalence of sole ulcers would be better controlled in free-stall barns since animals exercise more than do those in tie-stalls. Nevertheless,

prevalence of sole ulcers at both cow-level and herd-level is higher in free-stalls compared to tie-stalls [87, 99]. This can be explained by hard surfaces, such as concrete, commonly present in free stalls barns; excessive horn wear and standing long hours on concrete may predispose to CHDL. Indeed, the odds of sole ulcers and white line disease are more than 2 times higher in cows housed in conventional free-stalls than those housed in deep bedded packs [100]. All these data corroborate the impact of the type of terrain and floor system on claw pathologies, thus sole soft tissue and floor interaction warrants further investigation.

We showed that BCS had an influence on the thickness of the sole soft tissue as already reported by Bicalho et al. (2009) and Newsome et al. (2017) [15, 17]. However, our study failed to show differences in thickness between healthy and ulcerated claws. This finding calls into question the theory that thinner sole soft tissue is associated with sole ulceration. Yet, it must be noted that the BCS was quite homogeneous among the animals of this study and no extreme values were present, when compared to the study of Bicalho et al. (2009), where BCS ranged between 1.5 and 4 [15].

Histology of claw tissues presents several challenges. Decalcification of bone and de-keratinization of horn subjectively affected the quality of the stained samples in the present study. Paraffin embedding is widely used in morphological studies, but its high melting temperature may cause heat-induced changes to the tissues. Additionally, the presence of hard and soft tissues with a hardness and density different from those of the paraffin complicates microtome cutting. The use of methyl methacrylate (MMA) for the embedding of mineralized, soft and horny tissues may have multiple advantages such as the elimination of the need for decalcification and the preservation of tissue morphology without shrinkage [101]. This

material was not available in our laboratory, but warrants further investigation for its use as embedding material for claw tissues.

Histology results of this study are similar to those reported by Mochizuchi et al. (1994) where there was a high prevalence of tissues graded as 2 and 3 [68]. Microscopic evaluation of sole soft tissues confirmed that a higher proportion of adipose tissue is present in zone 6 compared to zone 4, reflecting the same findings as for sole soft tissue thickness. In both cases, however, we failed to detect a difference between healthy and ulcerated claws. The present study is, to our knowledge, the first that evaluated the bone-corium and corium-epidermis interface simultaneously. High prevalence of osteophytes in ulcerated claws may suggest chronicity of the lesions. Concomitant evaluation of the bone-corium interface of the wall suspensory apparatus and of the sole warrants further investigations in understanding pathophysiology of sole ulceration. Immunohistochemical studies on collagen fiber types of the suspensory and supportive apparatus of the claw and their possible differences in healthy and ulcerated tissues are needed.

CONCLUSIONS

Sole soft tissue of the bovine claw behaved as a viscoelastic material showing stress relaxation typical of soft tissues. Clinical and histological signs of sole ulceration were not associated with decreased strength of the supportive apparatus of the third phalanx in zone 4 in this study. Further investigation of sole soft tissue strength is needed, especially with regard to the lesions' stage and concomitant evaluation of the suspensory apparatus.

ACKNOWLEDGMENTS

This work constituted part of a Master's thesis by the first author. The work was funded by a research grant from the ACVS Foundation. The authors thank Dr. Caroline Constant

(Department of Clinical Sciences, Université de Montréal) for technical support throughout the project, Dr. Guy Beauchamp for statistical analysis and Mr. Raymond Boulais for the conception of the hand-made biopsy punch.

5.2 Figures

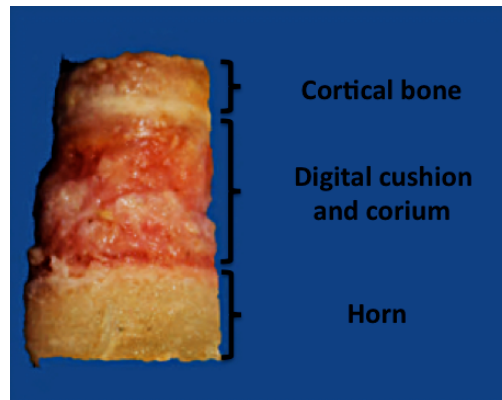


Figure 1: Cylindrical sample obtained from sole zone 4

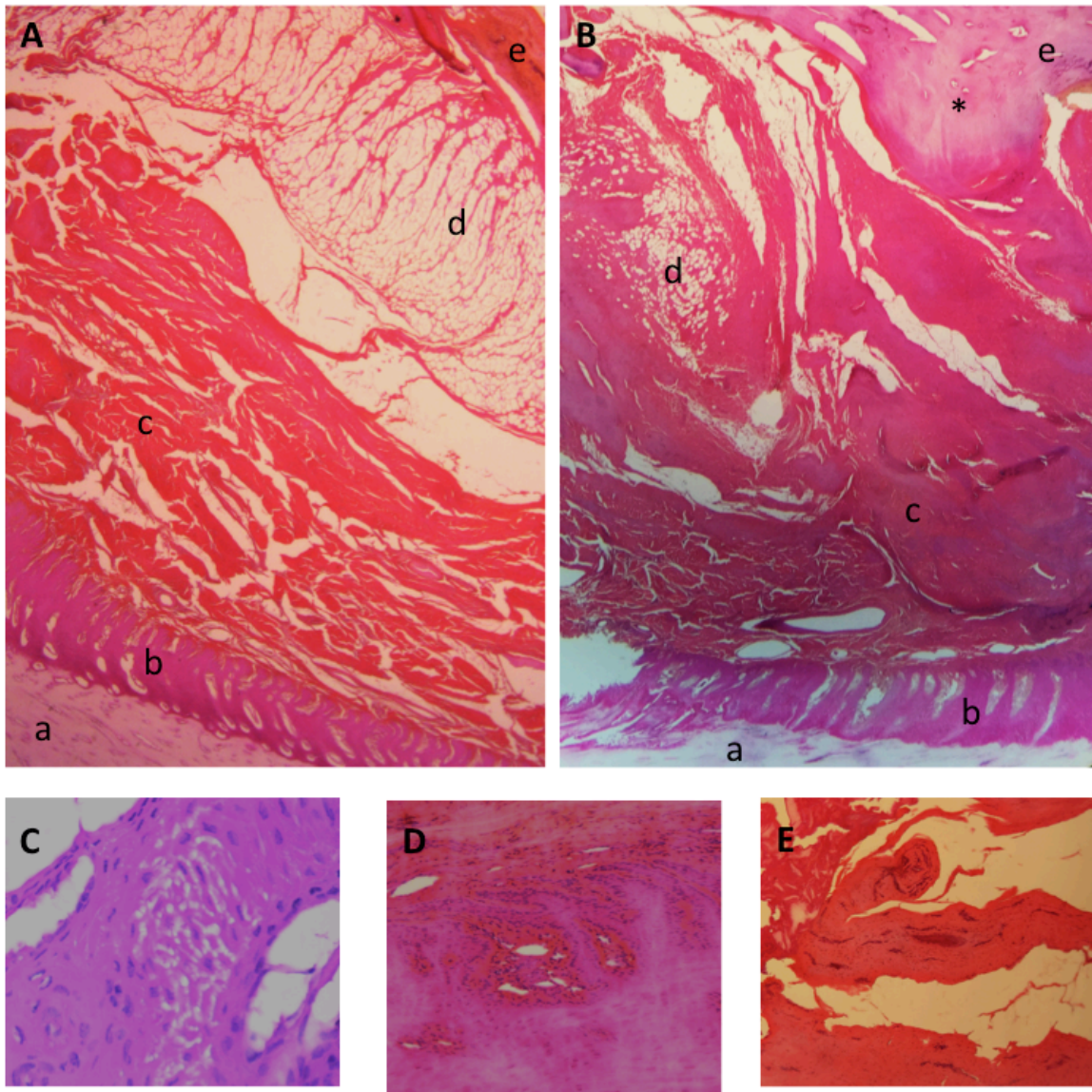


Figure 2: (A) Healthy claw, HPS stain, 1.25x, showing horn layer (a), living epidermis with tall and regular papillae (b), corium with well organized loose collagen (c) and well developed digital cushion (d) underneath the distal phalanx bone (e); (B) Ulcerated claw, HPS stain, 1.25x, showing horn layer (a), living epidermis with irregular papillae (b), corium containing disorganized and dense collagen with basophilic degeneration (c) and digital cushion (d), the distal phalanx bone (e) contains an osteophyte (*); (C) Ulcerated claw, HPS stain, 40x,

showing moderate intercellular edema (spongiosis); (D) Ulcerated claw, HPS stain, 10x, showing mild dyskeratosis; (E) Ulcerated claw, HPS stain, 10x, showing disorganized collagen, endothelial hypertrophy and moderately increased number of dermal vessels.

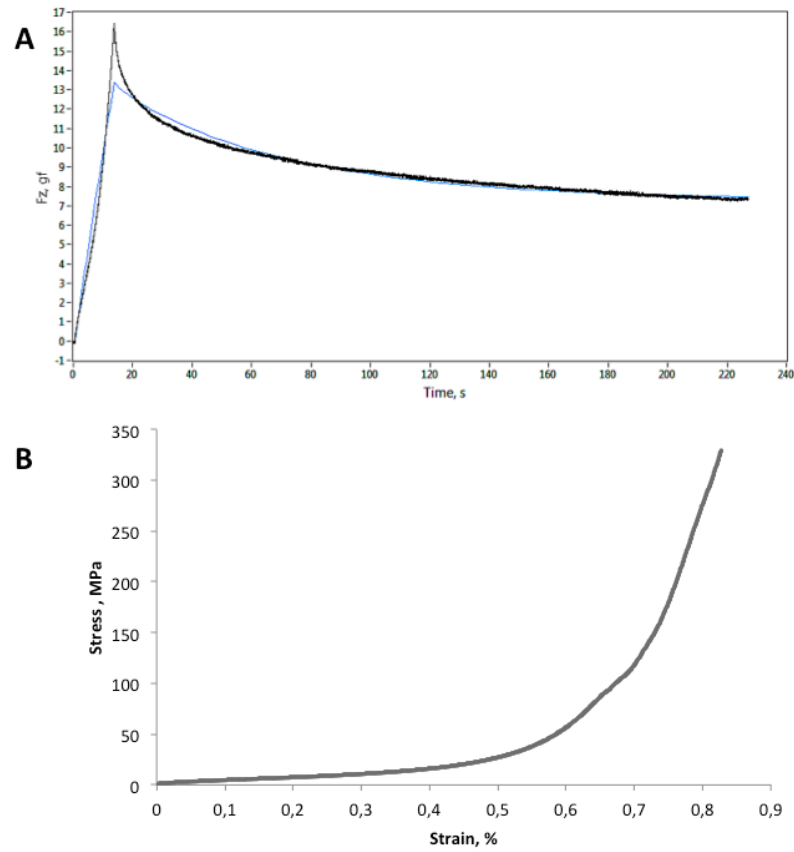


Figure 3: Representative experimental curves obtained from mechanical testing. (A) Stress relaxation curve for sole soft tissue (black line) with corresponding fibril network biphasic curve (blue line); (B) Uniaxial compression stress-strain curve for sole horn.

5.3 Tableaux

Table 1: Grading system for histology evaluation

Grade	Dermo-epidermal junction				Corium		
	Papillae	Living epidermis thickness	Dyskeratosis	Spongiosis	Microvasculature abnormalities	Collagen	Mineralization
1	Regular	Normal	Absent	Absent	Absent	Organized and loose	Absent
2	Regular	Decreased	Mild	Mild	Mild	Organized and loose	Mild
3	Irregular and flattened	Decreased	Moderate	Moderate	Moderate	Disorganized and dense without basophilic degeneration	Moderate
4	Irregular and flattened	Decreased	Severe	Severe	Severe	Disorganized and dense with basophilic degeneration	Severe

Table 2: Mechanical properties for sole soft tissue (E_m , k , E_f) and sole horn (E) expressed as mean (SD). ^a p=0.03

			Sole soft tissue			Sole horn
			E (MPa)	k (mm ² /MPa.s)	E_f (MPa)	E (MPa)
Zone 4	Healthy	claws	0.008 ± 0.003	0.624 ± 0.542	0.095 ± 0.041	36.191 ± 8.513
	(n=12)					
	Ulcerated	claws	0.008 ± 0.002	0.313 ± 0.285	0.112 ± 0.044	29.360 ± 9.306
	(n=7)					
Zone 6	Healthy	claws	0.008 ± 0.114	0.452 ± 0.365 ^a	0.105 ± 0.050 ^a	31.899 ± 12.875
	(n=9)					
	Ulcerated	claws	0.051 ± 0.114	0.128 ± 0.069 ^a	0.201 ± 0.104 ^a	34.490 ± 6.958
	(n=8)					

6. Discussion générale

L'ulcère de sole chez la vache laitière est une lésion affectant de manière significative le bien-être des animaux et la rentabilité des élevages, ce qui explique le grand intérêt qui y est porté. Malgré la recherche extensive déjà entreprise à ce sujet, peu est encore connu sur l'étiologie et la pathophysiologie de ces lésions. De là naît l'intérêt d'investiguer les propriétés mécaniques des tissus composant la sole de l'onglon bovin.

Le présent mémoire visait à caractériser les propriétés mécaniques des tissus de la sole de l'onglon bovin en fonction de la présence ou absence d'un ulcère de sole, et à les comparer avec l'aspect microscopique des tissus.

Cette étude a permis d'atteindre certains des objectifs établis et de confirmer certaines hypothèses. Nous avons pu confirmer que les tissus mous de la sole de l'onglon bovin se comportent comme un matériau viscoélastique présentant une relaxation des contraintes typique des tissus mous biologiques. La viscoélasticité implique une déformation élastique initiale suivie d'une déformation visqueuse en fonction du temps jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. La relaxation des contraintes décrit comment les tissus soulagent les contraintes sous déformation constante et dépend de l'amplitude et de la vitesse de la déformation. La déformation appliquée aux tissus a été définie dans une plage non destructive (déformation de 20 %), qui simule les circonstances physiologiques.

Malgré les signes macroscopiques et histologiques d'ulcération de la sole, seulement quelques différences dans les propriétés mécaniques des tissus mous de la sole entre onglons sains et ulcérés ont pu être démontrées dans cette étude. Comme nous avons émis l'hypothèse, le module du réseau de fibrilles (E_f) et la perméabilité (k) des tissus mous de la sole étaient significativement augmentés et diminués respectivement, chez les onglons ulcérés par rapport aux tissus sains. Cependant, cela n'était vrai que pour la zone 6. Une tendance similaire de réduction de la résistance viscoélastique à la compression a pu être identifiée pour la zone 4, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative. De plus, il n'a pas été possible de montrer un effet des variables indépendantes sur le comportement mécanique des tissus.

Notre choix de conception d'étude comporte inévitablement certaines limites. Comme il s'agissait d'une étude in vitro, les résultats doivent être interprétés avec prudence car d'autres facteurs peuvent jouer un rôle in vivo. Il est important de souligner la nature multifactorielle des CHDL; plusieurs facteurs de risque intrinsèques et extrinsèques sont connus pour être associés à l'incidence des lésions, tels que le type de stabulation et les surfaces de stabulation, la génétique des animaux ainsi que les maladies métaboliques et les changements hormonaux qui surviennent au cours de la vie productive de l'animal.

L'étude a été réalisée sur un petit échantillon de vaches de race Holstein au Québec, où plus que 90% des étables sont en stabulation entravée (www.dairyinfo.gc.ca). C'est pourquoi ces résultats ne peuvent être extrapolés à d'autres races, dans d'autres pays et/ou pour d'autres types de stabulation.

Des difficultés ont été rencontrées à plusieurs niveaux au courant de cette étude. L'étude se faisait sur des onglons de vaches laitières avec ou sans ulcération de la sole. La difficulté résidait dans le fait de trouver de tels onglons et les informations au sujet de l'âge, du poids, du SEC et du JEL de l'animal. Les onglons postérieurs latéraux des vaches euthanasiées à l'Hôpital des Animaux de la Ferme de la FMV ont été utilisés si sains ou s'ils ne présentaient pas de lésions autres qu'un ulcère de sole, et s'il était possible de les prélever le jour même de l'euthanasie afin de minimiser l'impact des changements post-mortem sur la biomécanique et l'anatomie des tissus.

Malgré la disponibilité de poinçons commerciaux pour biopsie cutanée d'un diamètre convenable pour cette étude, ceux-ci n'étaient pas assez coupants pour la corne de l'onglon bovin ni pour l'os de la phalange distale. Un poinçon artisanal en acier a donc été conçu. Ce poinçon présente 12 petites dents tranchantes et divergentes vers l'extérieur qui permettent une coupe franche de la corne, sans créer des dommages aux tissus mous. Le poinçon est utilisé en rotation à l'aide d'une perceuse à faible vitesse (250 tr/min) et sur tissus congelés afin de prévenir les traumatismes dus à la chaleur. Les échantillons obtenus avec cette méthode étaient de subjectivement bonne qualité.

Le fait d'avoir une combinaison de tissus mous et dur avec une dureté et une densité différentes de celle de la paraffine a compliqué la coupe au microtome. Dans le but de

surmonter ce problème, une décalcification du tissu osseux et une dé-kératinisation du tissu corné ont été réalisées. Ce processus nécessite l'utilisation séquentielle, post fixation au formol, d'un produit décalcifiant dont l'acide hydrochlorique est le principal composant, et d'hydroxyde de sodium, respectivement, en prenant soin de ne pas y exposer les tissus mous. Une exposition excessive de l'os au produit décalcifiant peut nuire à la coloration à l'hématoxyline, et créer des artefacts de coupe tels que la fragmentation. La détermination du point de décalcification optimale a été réalisée en évaluant la souplesse de l'os à toutes les 2 heures; une période de 24 heures a été jugée idéale. De la même façon, la détermination du point de dé-kératinisation a aussi été fixée à 24 heures. Cette méthodologie a permis d'obtenir des coupes histologiques acceptables. Toutefois plusieurs artefacts de coupe tels que la séparation des différentes couches des tissus étaient fréquemment observés; cela n'a toutefois pas empêché la lecture des lames ni la classification des tissus. L'utilisation de méthyl méthacrylate comme matériau d'enrobage pourrait être une alternative valide à l'enrobage avec paraffine pour les tissus de l'onglon. Cette méthode, apparemment jamais utilisée pour les tissus de l'onglon bovin, est réputée éliminer la nécessité de décalcification et permettre une préservation excellente de la morphologie des tissus [101].

La coloration PSR s'est révélée être inutilisable pour l'analyse quantitative morphométrique des fibres de collagène de type I et III. Selon l'orientation des fibres de collagène et des tissus sous la lumière polarisée, il y avait une variation de la biréfringence et un changement de couleur qui empêchaient de définir avec certitude le type de fibre de collagène. Lattouf et al. (2014) avait déjà montré, de manière similaire, l'incapacité de la coloration PSR à différencier le type de fibres de collagène [102]. Des techniques d'immunohistochimie seraient plus appropriées pour le typage des fibres de collagène.

Autre que pour la corne, les propriétés mécaniques des tissus mous de la sole de l'onglon n'ont jamais été testées. Le choix des paramètres utilisés pour les tests de relaxation de contrainte non confinée était basé sur des tests préliminaires et le choix du modèle mathématique était basé sur sa précédente utilisation pour la caractérisation des tissus cartilagineux. Les tests préliminaires ont montré des résultats encourageant l'exécution de l'étude principale. Bien qu'il ait été démontré que les tissus mous de la sole montrent un comportement viscoélastique, une corrélation entre un comportement mécanique altéré des

tissus entre onglons sains et ulcérés et les variables indépendantes examinées n'a pu être démontrée. Malgré que les résultats de la présente étude démontrent que le test de relaxation des contraintes en compression non confinée et que le modèle bi-phasique renforcé avec le réseau des fibrilles soient appropriés pour les tissus mous de l'onglon, l'utilisation de la compression confinée et d'un autre modèle mathématique pourraient être justifiée. Notamment la compression confinée pourrait être plus similaire aux conditions de charge *in vivo* puisque les tissus mous sont enfermés à l'intérieur de la boîte cornée. De plus le modèle visco-hyperélastique proposé pour l'étude du comportement mécanique du coussinet plantaire humain pourrait être plus approprié [36, 43]. Puisque les tissus biologiques sont composés de différents matériaux aux propriétés mécaniques spécifiques, ce qui signifie que les propriétés mécaniques peuvent varier d'un point à l'autre à l'intérieur du tissu, les échantillons utilisés dans cette étude, de petit diamètre, pourraient ne pas être représentatifs de la totalité des tissus de la sole. De plus, il est concevable que les tissus de la sole (appareil de support de la troisième phalange) opèrent de concert avec l'appareil de suspension de la troisième phalange dans la mécanique du pied bovin. En conséquence, des études mécaniques évaluant l'ensemble des tissus de l'onglon s'imposent.

Nos résultats ont montré que, bien qu'un lien entre BCS et épaisseur des tissus mous de la sole était présent, il n'y avait pas de différence d'épaisseur des tissus mous entre les onglons sains et ceux ulcérés, ni du pourcentage de tissu adipeux. Cela suggère qu'un amincissement des tissus mous de la sole n'est probablement pas le seul facteur prédisposant au développement des CHDL, comme précédemment proposé par Bicalho et al. [15]. Selon cette théorie, la contusion du chorion est, au moins en partie, une conséquence de la capacité réduite du coussinet digital à atténuer la pression exercée par la troisième phalange sur les tissus mous en dessous. Cette diminution dans la capacité d'absorption des chocs dériverait d'un amincissement du coussinet digital en lien avec le bilan énergétique négatif expérimenté en début lactation. Comme déjà suggéré par Newsome et al., d'autres mécanismes possibles sont à investiguer et pourraient inclure des changements aigus dans l'intégrité de l'appareil suspenseur de la troisième phalange qui auraient un impact sur les tissus mous de la sole [18].

Conclusion

La fréquence des ulcères de sole chez la vache laitière et leur impact économique et sur le bien-être animal suscitent des nombreuses recherches. Dans ce mémoire, une révision de l'anatomie microscopique des tissus de l'onglon, des propriétés mécaniques jusqu'à maintenant connues et de la pathogénèse de l'ulcère de sole et de leur processus de guérison tissulaire, a permis de mettre en évidence les lacunes toujours présentes dans les connaissances sur ce sujet. Cette étude a permis de mieux définir certains aspects biomécaniques de certains tissus de l'onglon bovin récemment évoqués comme contribuant à la pathogénèse des ulcères de sole. Les données de cette étude suggèrent que l'appareil de support de la troisième phalange pourrait avoir un poids inférieur à celui qui lui a été attribué jusqu'alors dans le développement des lésions. Cependant, certaines adaptations pourraient améliorer les techniques de recherche à la fois pour les études mécaniques et histologiques afin de mieux comprendre le problème *in vivo*. L'étude conjointe de la biomécanique de l'appareil suspenseur et de l'appareil de support de la troisième phalange est à prévoir.

Bibliographie

1. Murray, R.D., et al., *Epidemiology of lameness in dairy cattle: description and analysis of foot lesions*. Vet Rec, 1996. **138**(24): p. 586-91.
2. Machado, V.S., L.S. Caixeta, and R.C. Bicalho, *Use of data collected at cessation of lactation to predict incidence of sole ulcers and white line disease during the subsequent lactation in dairy cows*. Am J Vet Res, 2011. **72**(10): p. 1338-43.
3. Bicalho, R.C., et al., *Association between a visual and an automated locomotion score in lactating Holstein cows*. J Dairy Sci, 2007. **90**(7): p. 3294-300.
4. Daigle, M. and A. Desrochers. *Une stratégie collective pour améliorer la santé des onglons chez les troupeaux laitiers du Québec*. in *Symposium sur les bovins laitiers 2017*. 2017. Drummondville, QC.
5. Amory, J.R., et al., *Associations between sole ulcer, white line disease and digital dermatitis and the milk yield of 1824 dairy cows on 30 dairy cow farms in England and Wales from February 2003-November 2004*. Prev Vet Med, 2008. **83**(3-4): p. 381-91.
6. Willshire, J.A. and N.J. Bell, *An economic review of cattle lameness*. Cattle Practice, 2009. **17**(2): p. 136-141.
7. Cha, E., et al., *The cost of different types of lameness in dairy cows calculated by dynamic programming*. Prev Vet Med, 2010. **97**(1): p. 1-8.
8. Rusterholz, A., *Das spezifisch-traumatische Klauensohlengeschwür des Rindes*. Schweiz Arch Tierheilkd, 1920. **62**: p. 505-525.
9. Chew, K.H., *Chronic laminitis and sole ulceration in a dairy herd*. Can Vet J, 1972. **13**(4): p. 90-3.
10. Thoenfer, M.B., et al., *Histopathology of oligofructose-induced acute laminitis in heifers*. J Dairy Sci, 2005. **88**(8): p. 2774-82.
11. Danscher, A.M., T.H. Toelboell, and O. Wattle, *Biomechanics and histology of bovine claw suspensory tissue in early acute laminitis*. J Dairy Sci, 2010. **93**(1): p. 53-62.
12. Boosman, R., F. Nemeth, and E. Gruys, *Bovine laminitis: clinical aspects, pathology and pathogenesis with reference to acute equine laminitis*. Vet Q, 1991. **13**(3): p. 163-71.
13. Tarlton, J.F., et al., *Biomechanical and histopathological changes in the support structures of bovine hooves around the time of first calving*. Vet J, 2002. **163**(2): p. 196-204.
14. Lischer Ch, J., et al., *Suspensory structures and supporting tissues of the third phalanx of cows and their relevance to the development of typical sole ulcers (Rusterholz ulcers)*. Vet Rec, 2002. **151**(23): p. 694-8.
15. Bicalho, R.C., V.S. Machado, and L.S. Caixeta, *Lameness in dairy cattle: A debilitating disease or a disease of debilitated cattle? A cross-sectional study of lameness prevalence and thickness of the digital cushion*. J Dairy Sci, 2009. **92**(7): p. 3175-84.
16. Toholj, B., et al., *Evaluation of ultrasonography for measuring solar soft tissue thickness as a predictor of sole ulcer formation in Holstein-Friesian dairy cows*. Vet J, 2014. **199**(2): p. 290-4.

17. Newsome, R.F., et al., *A prospective cohort study of digital cushion and corium thickness. Part 1: Associations with body condition, lesion incidence, and proximity to calving.* J Dairy Sci, 2017. **100**(6): p. 4745-4758.
18. Newsome, R.F., et al., *A prospective cohort study of digital cushion and corium thickness. Part 2: Does thinning of the digital cushion and corium lead to lameness and claw horn disruption lesions?* J Dairy Sci, 2017. **100**(6): p. 4759-4771.
19. Budras, K.D., et al., *Bovine Anatomy: an illustrated text.* First edition ed. 2003.
20. Greenough, P.R. and J.J. Vermunt, *Evaluation of subclinical laminitis in a dairy herd and observations on associated nutritional and management factors.* Vet Rec, 1991. **128**(1): p. 11-7.
21. Shearer, J.K., et al. *The standardisation of input codes for capture lameness data in dairy records.* in *XII International Symposium on Lameness in Ruminants.* 2002. Orlando, Florida.
22. Mulling, C.H. and K.D. Budras, *Morphology of the dermal-epidermal junction of the bovine hoof with reference to its biological function.* Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 2002(89): p. 188-196.
23. Sakai, L.Y., et al., *Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils.* J Cell Biol, 1986. **103**(4): p. 1577-86.
24. Westerfeld, I., C.H. Mulling, and K.D. Budras. *Suspensory apparatus of the distal phalanx (Ph III) in the bovine hoof.* in *XI International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit, III International Conference on Bovine Lameness.* 2000. Parma, Italy.
25. van der Tol, P.P., et al., *The pressure distribution under the bovine claw during square standing on a flat substrate.* J Dairy Sci, 2002. **85**(6): p. 1476-81.
26. Schmid, T., et al., *High-speed cinematographic evaluation of claw-ground contact pattern of lactating cows.* Vet J, 2009. **181**(2): p. 151-7.
27. Eggers, T., *Die Wundheilung Des Rusterholzschens Klauengeschwures Beim Rind,* in *Institut für Veterinar-Anatomie* 2001, Freien Universität Berlin.
28. Mills, J.A., D.S. Zarlenga, and R.M. Dyer, *Bovine coronary region keratinocyte colony formation is supported by epidermal-dermal interactions.* J Dairy Sci, 2009. **92**(5): p. 1913-23.
29. Mills, J.A., et al., *Age, segment, and horn disease affect expression of cytokines, growth factors, and receptors in the epidermis and dermis of the bovine claw.* J Dairy Sci, 2009. **92**(12): p. 5977-87.
30. Tomlinson, D.J., C.H. Mulling, and T.M. Fakler, *Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity.* J Dairy Sci, 2004. **87**(4): p. 797-809.
31. Hendry, K.A., et al., *Synthesis and distribution of cytokeratins in healthy and ulcerated bovine claw epidermis.* J Dairy Res, 2001. **68**(4): p. 525-37.
32. Hendry, K.A., et al., *Basement membrane integrity and keratinization in healthy and ulcerated bovine hoof tissue.* J Dairy Res, 2003. **70**(1): p. 19-27.
33. Hendry, K.A., et al., *Effect of endocrine and paracrine factors on protein synthesis and cell proliferation in bovine hoof tissue culture.* J Dairy Res, 1999. **66**(1): p. 23-33.
34. Raber, M., et al., *The bovine digital cushion--a descriptive anatomical study.* Vet J, 2004. **167**(3): p. 258-64.
35. Jahss, M.H., et al., *Investigations into the fat pads of the sole of the foot: anatomy and histology.* Foot Ankle, 1992. **13**(5): p. 233-42.

36. Miller-Young, J.E., N.A. Duncan, and G. Baroud, *Material properties of the human calcaneal fat pad in compression: experiment and theory*. J Biomech, 2002. **35**(12): p. 1523-31.
37. Raber, M., et al., *The content and composition of lipids in the digital cushion of the bovine claw with respect to age and location--a preliminary report*. Vet J, 2006. **172**(1): p. 173-7.
38. Buschmann, W.R., et al., *Fatty acid composition of normal and atrophied heel fat pad*. Foot Ankle, 1993. **14**(7): p. 389-94.
39. Oikonomou, G., et al., *Short communication: Genetic characterization of digital cushion thickness*. J Dairy Sci, 2014. **97**(1): p. 532-6.
40. Pal, S., *Mechanical Properties of Biological Materials*, in *Design of Artificial Human Joints & Organs*, S. Pal, Editor. 2014, Springer Science + Business Media: New York. p. 419.
41. Callister, W.D., *Materials science and Engineering: an introduction*. Seventh edition ed. 2007.
42. Rome, K., *Mechanical properties of the heel pad: current theory and review of the literature*. The Foot, 1998. **8**: p. 179-185.
43. Natali, A.N., et al., *Biomechanical behaviour of heel pad tissue: experimental testing, constitutive formulation, and numerical modelling*. Proc Inst Mech Eng H, 2011. **225**(5): p. 449-59.
44. Soulhat, J., M.D. Buschmann, and A. Shirazi-Adl, *A fibril-network-reinforced biphasic model of cartilage in unconfined compression*. J Biomech Eng, 1999. **121**(3): p. 340-7.
45. Li, L.P., et al., *Nonlinear analysis of cartilage in unconfined ramp compression using a fibril reinforced poroelastic model*. Clin Biomech (Bristol, Avon), 1999. **14**(9): p. 673-82.
46. Winkler, B. and J.K. Margerison, *Mechanical properties of the bovine claw horn during lactation*. J Dairy Sci, 2012. **95**(4): p. 1714-28.
47. Borderas, T.F., et al., *Claw hardness of dairy cows: relationship to water content and claw lesions*. J Dairy Sci, 2004. **87**(7): p. 2085-93.
48. Franck, A., et al., *Biomechanical Properties of Bovine Claw Horn*. Biosystems Engineering, 2006. **93**(4): p. 459-467.
49. Hinterhofer, C., et al., *Elastic properties of hoof horn on different positions in the bovine claw*. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2005. **112**(4): p. 142-6.
50. Hinterhofer, C., et al., *Modulus of elasticity and dry-matter content of bovine claw horn affected by the changes of chronic laminitis*. Vet J, 2007. **174**(3): p. 605-9.
51. Winkler, B., *PhD Thesis: Mechanical properties of hoof horn, sole haemorrhage and lameness in dairy cattle*, in *Department of Biological Sciences, Faculty of Science*. 2005, University of Plymouth.
52. Leach, D.H. and G.C. Zoerb, *Mechanical properties of equine hoof wall tissue*. Am J Vet Res, 1983. **44**(11): p. 2190-4.
53. Apprich, V., et al., *Is moisture really the most important influencing factor on the mechanical properties of claw horn? Modulus of elasticity and dry-matter content in flat and contracted claws*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2008. **121**(3-4): p. 95-101.
54. Hinterhofer, C., et al., *The hardness of horn in different segments of the bovine claw*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2005. **118**(7-8): p. 334-40.

55. Clark, C. and L. Petrie, *Fracture toughness of bovine claw horn from cattle with and without vertical fissures*. Vet J, 2007. **173**(3): p. 541-7.
56. Fullmer, H.M., *A comparative histochemical study of elastic, pre-elastic and oxytalan connective tissue fibers*. J Histochem Cytochem, 1960. **8**: p. 290-5.
57. Knott, L., et al., *Effects of housing, parturition and diet change on the biochemistry and biomechanics of the support structures of the hoof of dairy heifers*. Vet J, 2007. **174**: p. 277-287.
58. Maierl, J., et al., *A method of biomechanical testing the suspensory apparatus of the third phalanx in cattle: a technical note*. Anat Histol Embryol, 2002. **31**: p. 321-325.
59. Hinterhofer, C., et al., *A finite element model of the bovine claw under static load for evaluation of different flooring conditions*. N Z Vet J, 2005. **53**(3): p. 165-70.
60. Hinterhofer, C., et al., *Development of a twenty-one-component finite element distal hind limb model: stress and strain in bovine digit structures as a result of loading on different floorings*. J Dairy Sci, 2009. **92**(3): p. 972-9.
61. Franck, A., B. Verheghe, and N. De Belie, *The effect of concrete floor roughness on bovine claws using finite element analysis*. J Dairy Sci, 2008. **91**(1): p. 182-92.
62. Ossent, P., P.R. Greenough, and J.J. Vermunt, *Laminitis*, in *Lameness in Cattle*, P.R. Greenough and A.D. Weaver, Editors. 1997, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 277-292.
63. Lischer, C.J. and P. Ossent, *[Bovine sole ulcer: a literature review]*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001. **114**(1-2): p. 13-21.
64. Gonzalez-Sangues, A. and J.K. Shearer. *The biomechanics of weight bearing and its significance with lameness*. in *12th International Symposium on Lameness in Ruminants*. 2002. Orlando, FL.
65. Toussaint Raven, E., D.J. Peterse, and R.T. Haalstra, *Cattle Footcare and Claw Trimming*. 1989.
66. Smedegaard, H.H., *Eksperimentel fremkaldelse af saleknusing hos kvaeg*. Nordisk Vet Med, 1964. **16**: p. 652-656.
67. Morgan, S.J., D.A. Grosenbaugh, and D.M. Hood, *The pathophysiology of chronic laminitis. Pain and anatomic pathology*. Vet Clin North Am Equine Pract, 1999. **15**(2): p. 395-417, vii.
68. Mochizuki, M., et al., *Histopathological findings of the digits in dairy cows in Japan*. J Vet Med Sci, 1994. **56**(6): p. 1029-1034.
69. Theoret, C.L. and J. Schumacher, *Equine wound management*. Third ed. 2017.
70. Fubini, S.L. and N.G. Ducharme, *Farm Animal Surgery*. Second ed, ed. S.L. Fubini and N.G. Ducharme. 2017, St. Louis, Missouri: Elsevier.
71. Shearer, J.K. and S.R. van Amstel, *Pathogenesis and Treatment of Sole Ulcers and White Line Disease*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2017. **33**(2): p. 283-300.
72. Eggers, T., et al. *Morphological aspects on wound healing of Rusterholz ulcer in the bovine hoof*. in *XI International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit, III International Conference on Bovine Lameness*. 2002. Parma, Italy.
73. van Amstel, S.R. and J.K. Shearer, *Review of Pododermatitis circumscripta (ulceration of the sole) in dairy cows*. J Vet Intern Med, 2006. **20**(4): p. 805-11.
74. van Amstel, S.R., J.K. Shearer, and F.L. Palin, *Case report - clinical response to treatment of pododermatitis circumscripta (ulceration of the sole) in dairy cows*. Bovine Practitioner, 2003. **37**(2): p. 143-150.

75. Lischer, C.J., et al., [*Healing process of uncomplicated sole ulcers in dairy cows kept in tie stalls: clinical description and blood chemical investigations*]. Schweiz Arch Tierheilkd, 2001. **143**(3): p. 125-33.
76. White, M.E., et al., *A randomized trial for evaluation of bandaging sole abscesses in cattle*. J Am Vet Med Assoc, 1981. **178**(4): p. 375-7.
77. Theoret, C.L., et al., *Preliminary observations on expression of transforming growth factors beta1 and beta3 in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue*. Vet Surg, 2002. **31**(3): p. 266-73.
78. Berry, D.B., 2nd and K.E. Sullins, *Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses*. Am J Vet Res, 2003. **64**(1): p. 88-92.
79. Knighton, D.R., I.A. Silver, and T.K. Hunt, *Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration*. Surgery, 1981. **90**(2): p. 262-70.
80. Sorensen, M.A., et al., *Regional disturbances in blood flow and metabolism in equine limb wound healing with formation of exuberant granulation tissue*. Wound Repair Regen, 2014. **22**(5): p. 647-53.
81. Pyman, M.F., *Comparison of bandaging and elevation of the claw for the treatment of foot lameness in dairy cows*. Aust Vet J, 1997. **75**(2): p. 132-5.
82. Lischer Ch, J., et al., *Effect of therapeutic dietary biotin on the healing of uncomplicated sole ulcers in dairy cattle--a double blinded controlled study*. Vet J, 2002. **163**(1): p. 51-60.
83. Shearer, J.K. and S.R. van Amstel, *Functional and corrective claw trimming*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2001. **17**(1): p. 53-72.
84. Boettcher, H.S., et al., *Technical note: Effects of frozen storage on the mechanical properties of the suspensory tissue in the bovine claw*. J Dairy Sci, 2014. **97**(5): p. 2969-73.
85. Tarlton, J.F. and A.J. Webster. *Biochemical, biomechanical and histological analyses of failure of supportive structures in cattle hooves*. in *British society of animal science annual meeting*. 2000. Scarborough.
86. Junqueira, L.C., W. Cossermelli, and R. Brentani, *Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy*. Arch Histol Jpn, 1978. **41**(3): p. 267-74.
87. Cramer, G., et al., *Herd- and cow-level prevalence of foot lesions in Ontario dairy cattle*. J Dairy Sci, 2008. **91**(10): p. 3888-95.
88. Hultgren, J., T. Manske, and C. Bergsten, *Associations of sole ulcer at claw trimming with reproductive performance, udder health, milk yield, and culling in Swedish dairy cattle*. Prev Vet Med, 2004. **62**(4): p. 233-51.
89. Singh, S.S., W.R. Ward, and R.D. Murray, *An angiographic evaluation of vascular changes in sole lesions in the hooves of cattle*. Br Vet J, 1994. **150**(1): p. 41-52.
90. Greenough, P.R., et al., *Laminitis-like changes in the claws of feedlot cattle*. Can Vet J, 1990. **31**(3): p. 202-8.
91. Logue, D.N., J.E. Offer, and R.D. McGovern, *The bovine digital cushion--how crucial is it to contusions on the bearing surface of the claw of the cow?* Vet J, 2004. **167**(3): p. 220-1.
92. Huxley, J.N., *Lameness in cattle: an ongoing concern*. Vet J, 2012. **193**(3): p. 610-1.

93. Korhonen, R.K., et al., *Fibril reinforced poroelastic model predicts specifically mechanical behavior of normal, proteoglycan depleted and collagen degraded articular cartilage*. J Biomech, 2003. **36**(9): p. 1373-9.
94. Hsu, T.C., Y.S. Lee, and Y.W. Shau, *Biomechanics of the heel pad for type 2 diabetic patients*. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2002. **17**(4): p. 291-6.
95. Bennett, M.B. and R.F. Ker, *The mechanical properties of the human subcalcaneal fat pad in compression*. J Anat, 1990. **171**: p. 131-8.
96. Menard, A.L., et al., *Effect of cold storage and freezing on the biomechanical properties of swine growth plate explants*. J Biomech Eng, 2014. **136**(4).
97. Aerts, P., et al., *The mechanical properties of the human heel pad: a paradox resolved*. J Biomech, 1995. **28**(11): p. 1299-308.
98. Gard, J.A., et al., *Effect of exercise and environmental terrain on development of the digital cushion and bony structures of the bovine foot*. Am J Vet Res, 2015. **76**(3): p. 246-52.
99. Sogstad, A.M., et al., *Prevalence of claw lesions in Norwegian dairy cattle housed in tie stalls and free stalls*. Prev Vet Med, 2005. **70**(3-4): p. 191-209.
100. Solano, L., et al., *Prevalence and distribution of foot lesions in dairy cattle in Alberta, Canada*. J Dairy Sci, 2016. **99**(8): p. 6828-6841.
101. Velde, J.T., et al., *Methyl-methacrylate as an embedding medium in histopathology*. Histopathology, 1977. **1**(5): p. 319-30.
102. Lattouf, R., et al., *Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(10): p. 751-8.